

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES  
**SUR LA LYOPHILISATION ET LA CONSERVATION  
PAR LE FROID DE QUELQUES SPIROCHÈTES**

par P. GASTINEL, A. HAMELIN, A. VAISMAN et F. DUNOYER (\*)

(Institut Alfred-Fournier)

La lyophilisation est un procédé actuellement très utilisé pour la conservation des souches bactériennes et des virus. Elle a, par contre, été peu appliquée dans l'étude des spirochètes et les résultats obtenus ont été souvent discordants. Notons en particulier le travail de Hampp [1] paru en 1947, sur la conservation après lyophilisation de *Borrelia vincenti* et de souches cultivables non pathogènes de *Treponema pallidum*. D'autre part, Turner et coll. [2], en ce qui concerne les tréponèmes de la syphilis et du pian, Stavitsky [3], pour les leptospires, échouèrent en essayant de conserver ces spirochètes par le froid à l'état sec, car ils ne retrouvaient plus leur vitalité et leur pouvoir pathogène. Cependant Hampp [4], en 1951, a conservé le tréponème pâle, souche Nichols pathogène, par lyophilisation de la totalité du testicule d'un lapin syphilisé, avec maintien de la virulence.

Notre expérimentation a porté sur *Treponema pallidum*, souche Nichols pathogène, sur *Leptospira ictero-hemorragiae*, sur *Borrelia duttoni*, *Borrelia hispanica* et enfin sur le tréponème de culture, souche Reiter. Rappelons que les antigènes de ce trépo-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 novembre 1957.

nème, isolés par d'Alessandro et Puccinelli, peuvent être employés pour le diagnostic sérologique de la syphilis dans des conditions que nous avons antérieurement précisées [5].

#### A. — ESSAIS DE LYOPHILISATION DE *T. pallidum*.

On peut partir de suspensions de spirochètes très riches en parasites telles qu'elles sont préparées pour la technique du test de Nelson. Nous avons utilisé aussi le testicule entier, placé dans le milieu de survie. Enfin nous avons également pratiqué la lyophilisation de fragments testiculaires.

1<sup>o</sup> *Essais avec des suspensions spirochéticiennes.* — La lyophilisation a été faite pendant quatre heures dans des ampoules conservées ensuite à +4° C. Au quatrième jour, le contenu de l'ampoule fut remis en contact avec du sérum physiologique. L'examen sur fond noir montra que la majorité des parasites étaient détruits ; en effet, on n'observa que de rares tréponèmes, de morphologie normale, mais tous immobiles. Ce matériel inoculé dans le testicule du lapin ne provoqua aucune manifestation spécifique. D'autres ampoules lyophilisées furent ouvertes à des dates différentes ; dans tous les cas, on retrouva les mêmes aspects morphologiques et les mêmes résultats négatifs de transfert.

2<sup>o</sup> *Essais avec une orchite de lapin placée en milieu de survie.* — Vingt-quatre heures après la lyophilisation, l'ampoule fut ouverte et le matériel remis en suspension ; l'examen sur fond noir montra seulement quelques spirochètes typiques mais complètement immobiles. L'inoculation dans le testicule d'un lapin demeura sans effet après cent cinquante jours d'observation. Des souris reçurent également le contenu d'une ampoule lyophilisée. Sacrifiées au cent vingtième jour, on ne constata chez ces dernières aucune dispersion tréponémique dans les endroits de prédilection.

3<sup>o</sup> *Essais avec une orchite syphilitique, coupée en fragments, de teneur en spirochètes très abondante.* — Aussitôt après la lyophilisation, on décela au fond noir la présence de spirochètes bien conservés, non modifiés dans leur morphologie mais complètement immobiles.

Un des fragments lyophilisés fut utilisé comme greffon, inséré sous le scrotum d'un lapin neuf. Aucun résultat ne fut obtenu après quatre-vingt-dix jours d'observation.

Ainsi donc, avec les différents matériaux employés, nos essais de lyophilisation ne se sont soldés que par des échecs. En aucun cas le tréponème ne conserva sa mobilité et son pouvoir pathogène.

Par contre et par comparaison, nous avons soumis au froid des fragments d'orchite soit congelés à  $-70^{\circ}\text{C}$  puis conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , soit congelés d'emblée à  $-20^{\circ}\text{C}$  et conservés à cette même température. Ces fragments ont été retirés de la glacière le dix-neuvième jour. L'examen sur fond noir montra la présence de tréponèmes typiques, bien mobiles pour la plupart, et le transfert sous-scrotal au lapin mit en évidence le maintien de la virulence des spirochètes.

Turner, en 1938 [6], Turner et Fleming [7], en 1939, avaient noté la conservation de la virulence du tréponème pâle par la congélation à  $-78^{\circ}\text{C}$  de fragments de testicules syphilitiques. A cette température, l'infectiosité fut maintenue jusqu'à trois ans, mais elle ne le fut que deux mois quand la température n'excéda pas  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gastinel et Fasquelle avaient fait en 1939 (non publié en raison des événements) les mêmes constatations avec un fragment de syphilome scrotal gardé à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le pouvoir pathogène a été retrouvé trois mois après.

Le froid a été également employé dans l'expérimentation de McLeod et Arnold [8] en 1949 et dans celle de Chorpennig et coll. [9] en 1952. Ces auteurs utilisèrent les orchites conservées à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans la pratique des réactions d'immobilisation du tréponème. Ils avaient constaté, d'autre part, que les fragments congelés provoquaient des lésions expérimentales après une incubation un peu plus prolongée. Nous avons vérifié ce fait dans nos expériences actuelles : un fragment conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  depuis dix-neuf jours n'a donné un syphilome par greffe sous-scrotale qu'après soixante-six jours. Mais si le fragment a d'abord subi une congélation à  $-70^{\circ}\text{C}$  puis a été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , la durée d'incubation tombe à trente jours.

#### B. — ESSAIS DE LYOPHILISATION DE *Leptospira ictero-hemorragiae*.

Nos tentatives ont porté soit sur des cultures en milieu de Reiter et Rame, soit sur des organes de cobayes infectés par le leptospire.

La lyophilisation fut effectuée sur une culture de 5 jours, très riche, et une ampoule fut ouverte aussitôt après. L'examen sur fond noir montra des leptospires nombreux mais totalement immobiles et ayant généralement perdu leur forme spiralée classique. Des repiquages sur milieu nutritif restèrent tous stériles. D'autres ampoules ouvertes à des dates différentes fournirent des éléments ayant le même aspect morphologique que ceux de la première ampoule. La subculture resta sans succès et les inoculations intraperitoneales au cobaye demeurèrent sans effet.

Dans une autre série d'expériences, les organes d'un cobaye

infecté depuis quatre jours furent lyophilisés pendant quatre heures. Les ampoules ouvertes le même jour montrèrent des spirochètes plus ou moins déformés, mais tous immobiles. Aucun résultat ne fut obtenu par culture ou inoculation.

D'autre part, des organes de cobaye furent également conservés à — 20° C, sans lyophilisation préalable. Au dix-huitième jour, l'examen des fragments montra des leptospires immobiles, mais bien constitués. Ces fragments d'organes furent inoculés dans le péritoine de cobayes qui ne présentèrent aucune réaction. On s'assura que les animaux n'étaient pas en état d'infection inapparente par passage du sang du cœur dans le péritoine d'un animal neuf.

Cependant Turner et Fleming signalent qu'ils ont pu conserver à — 70° C, plusieurs mois, certains échantillons de *L. ictero-hemorragiae*. Turner et Brighton [10] ont recommandé de défibriner d'abord le sang avant de le soumettre à la congélation. Nous avons effectué des essais successifs en congelant à — 80° C ou à — 20° C soit du sang défibriné, soit des cultures, soit des fragments de rate. Avec ces différents produits injectés au cobaye par voie péritoneale, il nous fut impossible, avec notre souche, d'infecter l'animal. Aucun des sujets en expérience n'a fait la preuve d'une maladie inapparente par passage de son sang. Malgré de nombreux essais, il nous a donc été impossible de confirmer la conservation de *Leptospira ictero-hemorragiae* par les techniques de congélation, au moins avec la souche utilisée dans nos expériences.

#### C. — ESSAIS DE LYOPHILISATION DE *Borrelia duttoni* ET DE *Borrelia hispanica*.

Le matériel lyophilisé dans ces tentatives a été, soit le sang de souris à la phase aiguë de l'infection récurrentielle, soit le cerveau à la phase chronique, soit une culture de ces spirochètes en milieu Chorine. Après dessiccation sous congélation, nous avons retrouvé les *Borrelia* plus ou moins bien conservés dans leur morphologie, mais toujours immobiles. L'inoculation intraperitoneale de ce matériel lyophilisé à des souris neuves n'infecta aucun animal, alors que le même matériel non lyophilisé était bien virulent pour les souris témoins.

En ce qui concerne la conservation à la température de — 70° C, Turner et Brighton [10] obtinrent, en 1939, pour *Borrelia duttoni*, des résultats positifs. Ces auteurs recommandent de soumettre à la congélation soit du sang défibriné, soit du plasma et de veiller à ce que la décongélation soit toujours rapidement effectuée. Vitalité et virulence sont alors constatées pendant plusieurs mois, avec une baisse du pouvoir pathogène si la congélation n'a été

pratiquée qu'à — 20° C. Personnellement, nous avons infecté des souris avec du cerveau inoculé dans la cavité péritonéale. Au sixième jour, des *Borrelia* ont été trouvés dans le sang. L'animal fut sacrifié, la masse sanguine défibrinée et congelée à — 78° C. L'examen au fond noir montra des spirochètes déformés et immobiles. L'inoculation de ce matériel effectuée dans le péritoine de souris a donné un résultat positif au huitième jour, alors que, avant la congélation, ce même sang provoquait l'infection de la souris dès le deuxième jour. Ainsi retrouve-t-on l'incubation nettement prolongée avec un matériel préalablement congelé.

#### D. — ESSAIS DE LYOPHILISATION DU TRÉPONÈME REITER.

Cette souche non pathogène a fait l'objet des recherches de Hampp qui a obtenu sa conservation pendant plusieurs mois après dessiccation sous congélation. L'auteur utilisait un milieu spécial à la thiopeptone, mélangé à parties égales avec de la mucine gastrique à 1 p. 100 et après chauffage au bain-marie pour éliminer l'air ; ce milieu est enrichi avec 0,5 cm<sup>3</sup> d'ascite et 0,5 cm<sup>3</sup> d'une solution à 1 p. 100 de glutathion. Dans ces conditions, il est parvenu à conserver la vitalité d'une culture lyophilisée. Dans nos expériences, nous sommes partis d'une culture de tréponème Reiter en milieu de Brewer au thioglycollate. L'âge de la culture a varié dans nos différents essais entre 2, 3, 6, 7, 10, 13, 34, 40, 90 et 139 jours. La conservation de la vitalité du tréponème a été obtenue avec plein succès en utilisant les cultures de 2, 3, 6, 7, 10 et 13 jours. Elle a au contraire échoué en employant les cultures de 34, 40, 90 et 139 jours. Ainsi, apparaît-il que les cultures jeunes se prêtent mieux à la conservation par lyophilisation, alors que pour les cultures plus âgées on ne peut utiliser ce procédé.

La vitalité de la souche lyophilisée a été observée jusqu'au deux cent quinzième jour de conservation. Nous avons remarqué, comme Hampp d'ailleurs, que les ampoules ouvertes à différentes époques donnaient des repiquages positifs avec des retards un peu plus marqués selon les délais de conservation. Ainsi, une ampoule lyophilisée depuis vingt-quatre heures donna un repiquage positif en quarante-huit heures. Au deux cent quinzième jour, le départ de la nouvelle culture ne s'effectua que vers le cinquième jour. Nous avons quelquefois observé un retard allant jusqu'au onzième jour.

Dans nos différentes recherches, une culture lyophilisée remise en suspension dans le milieu de culture d'origine ou dans du sérum physiologique permit de retrouver sur fond noir des spirochètes Reiter morphologiquement bien conservés, mais, en règle générale, tous immobiles. Ils ont inconstamment maintenu leurs

tours de spire et souvent on observa des formes plus ou moins longues ou seulement filamenteuses. L'immobilité de ces tréponèmes ne peut préjuger des résultats positifs ou négatifs de la subculture.

Le tréponème Reiter supporte la congélation à — 80° C. Sa morphologie reste inchangée, mais le spirochète est immobilisé. Cependant, la culture effectuée aussitôt après la congélation est positive. Si la conservation est faite à — 20° C pendant vingt-cinq jours après congélation initiale à — 80° C, la culture est également positive, mais avec un léger retard.



Les résultats obtenus dans nos protocoles présentent de sérieuses difficultés d'interprétation. Le procédé de conservation sous dessication ne nous a donné de succès qu'avec la souche Reiter, et nous avons constamment échoué avec le tréponème pâle, le leptospire et les *Borrelia*.

La conservation à — 80° C permet de garder la virulence du tréponème pâle et des *Borrelia*. Seul, le tréponème Reiter est conservable à la fois par la technique de lyophilisation ou par le froid.

Sans doute convient-il de chercher dans la constitution chimique des germes spirochétiens les raisons de leur comportement différent : les parasites paraissant très résistants, comme le Reiter, sont plus aisément conservables par les différentes techniques du froid ; mais, probablement, y a-t-il lieu aussi de considérer la phase dans laquelle se trouve le germe, puisqu'une culture de tréponème Reiter paraît à certains moments plus apte qu'à d'autres à être conservée par la technique de lyophilisation. Et ceci rejoint les problèmes très complexes de la morphologie évolutive du parasite. Enfin, il semble que l'obtention de repiquages positifs est d'autant plus retardée que la durée de conservation après lyophilisation est plus longue.

## SUMMARY

### STUDIES ON LYOPHILISATION AND COLD PRESERVATION OF SOME SPIROCHETES.

The experiments have been carried out on *Treponema pallidum* (Nichols pathogenuous strain), *Leptospira ictero-hemorragiae*, *Borrelia duttoni* and *Borrelia hispanica*, and on Reiter's *Treponema*.

1° The lyophilisation of *Treponema pallidum* suspensions or of rabbit orchitis material does not allow any preservation of the

parasite which loses its mobility and its pathogenicity. On the contrary, this pathogenicity is preserved by congelation at — 80° C.

2° *L. ictero-hemorragiae* can be preserved neither by lyophilisation nor by congelation at — 80° C or — 20° C of defibrinated blood, cultures or part of organs. The material so treated induce neither an apparent nor an inapparent infection in animals.

3° *B. duttoni* and *B. hispanica* cannot be lyophilised, but their virulence is preserved by congelation at — 80° C.

4° Reiter's Treponema is preserved by lyophilisation, particularly in young cultures (2 to 13 days). Its viability has even been observed after 215 days; although immobile, it might be subcultured. It resists to congelation at — 80° C and, although it is immobile, positive subcultures prove its viability.

The interpretation of these findings is difficult. An important factor certainly is the phase in which the germ is found and this factor is related to the complex phenomenon of the evolutive morphology of the parasite.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HAMPP (E. G.). *J. Dental Assoc.*, 1947, **34**, 317 et 606.
- [2] TURNER (T. B.), ZAUER (J. H.) et KLUTH (F. C.). *Am. J. med. Sci.*, 1941, **202**, 416.
- [3] STAVITSKY (A. B.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 118.
- [4] HAMPP (E. G.). *Publ. Hlth Rep.*, 1951, **66**, 501.
- [5] GASTINEL (P.), VAISMAN (A.) et HAMELIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 249.
- [6] TURNER (T. B.). *J. exp. Med.*, 1938, **67**, 61.
- [7] TURNER (T. B.) et FLEMING (W. L.). *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 629.
- [8] MCLEOD (Ch. P.) et ARNOLD (R. C.). *J. vener. Dis.*, 1949, **30**, 104.
- [9] CHORPENNING (F. W.), KENT (J. F.) et SANDERS (R. W.). *Am. J. Syph.*, 1952, **36**, 401.
- [10] TURNER (T. B.) et BRIGHTON. *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 639.

# **LES DISTOMATOSES HÉPATIQUES HUMAINES EN FRANCE**

par Robert DESCHIENS (\*).

(*Institut Pasteur*)

Les distomatoses hépatiques, maladies parasitaires dues à l'infestation des voies biliaires par des vers trématodes, les douves, s'observent en France, chez l'homme, beaucoup moins exceptionnellement qu'on ne l'a cru longtemps. G. Lavier a fait, en 1950, une mise au point de ce problème nosologique [1].

Les deux douves, d'ailleurs cosmopolites, qui suscitent la maladie, dans nos provinces métropolitaines, sont la grande douve *Fasciola hepatica* (Linné, 1758), très fréquente chez le mouton, commune chez les bovidés (1) et, beaucoup plus rarement, la petite douve *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1818), parasite des ruminants.

La distomatose hépatique autochtone est observée chaque année en France, particulièrement en été et en automne, sous la forme de bouffées épidémiques surtout familiales ou atteignant de petites collectivités et ayant, habituellement, pour origine la consommation, souvent au cours d'un repas pris en commun, de cresson cru récolté dans des cressonnières contaminées (cressonnières sauvages).

Les provinces françaises où la distomatose sévit plus particulièrement se situent au sud de la Loire ; le Lyonnais et les Dombes, le Massif Central et le Sud-Ouest sont les régions où la maladie est signalée avec le plus de fréquence. Cependant, des sources de contamination humaine, reconnues, existent, bien qu'avec une moindre fréquence au nord de la Loire — pour conserver cette ligne de partage schématique — singulièrement en Flandre, en Lorraine, en Franche-Comté, en Normandie, en Mayenne et en Bretagne.

(\*) Manuscrit reçu le 7 octobre 1957.

(1) Cette distomatose est rare chez la chèvre et le porc et exceptionnelle chez le cheval.

\*\*

La grande douve *F. hepatica* a été observée, en France, chez le mouton, dès 1379, par Jehan de Brie, Intendant des bergeries de Charles V ; les mollusques qui lui servent d'hôtes intermédiaires appartiennent au genre *Limnaea*. Les limnées, mollusques d'eau douce, comprennent de par le monde de nombreuses espèces dont 21 permettent l'évolution du ver. En France, quatre de celles-ci existent : *Limnaea truncatula*, *L. stagnalis*, *L. palustris* et *L. peregra* ; c'est la première surtout, petite espèce répandue partout, vivant dans les collections d'eau minimes, préférant la vase à l'eau courante, qui assume le rôle principal. Les moutons ou les bovidés dont les déjections contiennent les œufs de grande douve souillent l'eau ; un embryon sort de l'œuf après une quinzaine de jours, pénètre dans le mollusque et donne toute une série de formes larvaires ; cette évolution qui dure, suivant la saison, cinq à quatorze semaines, aboutit à la sortie de larves nommées cercaires, véritables petits distomes pourvus d'une queue avec laquelle ils nagent quelques heures jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec un support : plante aquatique ou herbe submergée ; la queue disparaît alors, la larve s'enkyste ; c'est cette cercaire enkystée et elle seule qui constitue la forme infectante. La paroi kystique, relativement très épaisse, la protège efficacement contre les agents extérieurs, en particulier froid et dessiccation. Le végétal qui sert de support peut être quelconque ; on conçoit avec quelle facilité les herbivores seront infectés. Pour l'homme, c'est par le cresson, le seul végétal aquatique faisant partie de son alimentation et, généralement consommé cru, tel quel ou assaisonné d'une vinaigrette bien incapable de tuer les kystes. Il convient, ici, de préciser une chose : le cresson, de culture, étant donné ses conditions de production, ne présente aucun danger. Mais, par contre, le cresson sauvage doit *toujours* être tenu pour suspect. A Paris, où n'arrive que du cresson de culture (10 000 tonnes, environ, de consommation annuelle), tous les cas de distomatose observés proviennent d'ailleurs.

Lorsque le kyste infestant est ingéré, les sucs digestifs dissolvent sa paroi ; le petit distome s'échappe et s'enfonce dans la muqueuse du duodénum et du jéjunum et il gagne le foie, surtout par voie transpéritonéale, perforant alors la capsule de Glisson pour y pénétrer, et, également, par voie sanguine portale.

De toute façon, le petit distome gagne la lumière des voies biliaires en forant son chemin dans le parenchyme et en perforant l'épithélium bilaire.

L'ingestion de foie cru de mouton ou de chèvre, infesté et contenant des formes très jeunes du parasite pourrait, selon certains auteurs (Strong, 1944), réaliser une contamination, proba-

blement par migration cholédocienne, des jeunes douves ingérées, vers le foie du nouvel hôte ; si cette éventualité est réalisable, elle ne peut être, évidemment, qu'exceptionnelle.

On conçoit que, pour peu qu'il y ait un certain nombre de vers, le traumatisme réalisé par leur cheminement qui peut durer plusieurs semaines ait une expression clinique particulièrement intense qui signalera le début de la maladie par un état toxico-infectieux (d'Allaines, Lavier et Gandille, 1942) ou un syndrome pseudo-typhique (Roubier, Morenas et Lavabre, 1937). Installées dans les voies biliaires, les douves y deviennent adultes, manifestant leur présence par l'apparition d'œufs (de trois à quatre mois après l'infestation). Elles constituent, alors, un facteur d'inflammation chronique pour la muqueuse biliaire, qui va subir une transformation, et un obstacle pour l'écoulement du liquide ; la stase, ainsi produite, favorisera les infections secondaires ; la distomatose constitue, en outre, un facteur de lithiasie. Comme la grande douve peut persister longtemps (au moins treize années), on aura donc, après l'expression aiguë du début, une phase chronique simulant singulièrement la lithiasie et dont le long déroulement, parfois presque latent, sera entrecoupé d'épisodes sub-aigus, aigus ou, même, suraigus.

Les petites épidémies de distomatose à grande douve sont toujours localisées et en connexion avec des épizooties ou les endozooties de même nature qui sévissent sur les bestiaux ou sur les troupeaux (ovins, bovins). Daulouede (1954) [2] a bien noté, pour le pays basque, que les animaux vivant dans les régions encassées (vallées, bas-fonds, « barthes ») et s'abreuvant dans les ruisseaux, les mares, les fossés et les rigoles, sont, généralement, plus atteints que les animaux vivant sur les hauteurs ou dans les pâturages traités par la chaux ou par le sulfate d'ammoniaque. Les populations humaines de ces territoires sont corrélativement plus exposées.

L'incident épidémiologique générateur de la distomatose humaine est pratiquement toujours un repas de cresson sauvage ; cependant, la manipulation de cresson (cas de l'épicierie de Brouet, Marche et Leprat, 1951) ou la consommation d'eau de fontaine infestée (cas de Sédallian, Maral et Perrin, 1949) peuvent conduire à l'ingestion de cercaires enkystées et être à l'origine d'une contamination. Les bouffées épidémiques, d'aspect pour ainsi dire standardisé, sont relativement fréquentes, surtout en été et en automne. Certains de leurs caractères ont été bien étudiés par Garin [3].

Le relevé des observations de distomatose hépatique humaine, publiées de 1942 à 1957 (2), est révélateur de la fréquence rela-

(2) Pour la documentation antérieure à 1939, consulter Bürgi [4] et Garin (*loc. cit.*).

tive de l'helminthiase mais, en réalité, la maladie apparaît comme bien plus diffusée si l'on ajoute à ces cas ceux qui sont communiqués, sans être publiés, par nos confrères, ainsi que les données statistiques des laboratoires pratiquant la recherche coprologique des œufs des parasites et les réactions sérologiques spécifiques (réaction de déviation du complément, réaction d'hypersensibilité cutanée) comme le Laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur et le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Lyon, par exemple.

Nous rappelons, dans ce rapport, les principaux incidents épidémiologiques relatifs à la distomatose hépatique qui ont fait l'objet de communications :

*Sud de la Loire.* — Lavier a observé quatre cas sévères contractés dans le Bourbonnais et comprenant plusieurs formes cliniques d'éosinophilie fébrile. Griffiths, Vaurès, Perrot et Mazen [5], en 1943, dans le Puy-de-Dôme, à Clermont-Ferrand, ont décrit une épidémie familiale.

Dans la région roannaise, deux épidémies furent observées, l'une par Bouysset, Joinaux et Philippe [6], en 1943, l'autre par Morenas, Fumoux et Vacheron, en 1944.

En Beaujolais, Sédallian, Maral et Perrin [7], en 1949, observèrent une épidémie familiale dont l'une des particularités fut d'avoir frappé des femmes et des enfants consommant une eau de fontaine à cresson sauvage, alors que les hommes, francs buveurs de vins, demeurèrent indemnes.

Coudert et Triozon [8] viennent de relever, dans la région sud-est de la France (1956-1957), une épidémie de distomatose hépatique comportant 500 cas environ.

Aymes et Caillol font état, en 1949, d'une épidémie familiale de distomatose à *F. hepatica* observée dans les Bouches-du-Rhône (Comité médical des Bouches-du-Rhône, 1949).

Brouet, Marche et Leprat [9], en 1951, décelèrent plusieurs cas de distomatose hépatique, chez les membres d'une même famille parisienne ayant passé des vacances d'été en Aveyron (3).

Entre 1953 et 1954, les médecins et les services sanitaires des Basses-Pyrénées et du Pays basque ont révélé l'existence d'un foyer relativement actif de distomatose à *F. hepatica*, aux environs de Bayonne ; ses aspects épidémiologiques et cliniques ont été bien étudiés par nos confrères basquais : Mercier des Rochettes, Lhosmot, Lescat et Souchard [10]; Lesca et Penaud [11]; Lemoine et Gabarra [12]. Le versant médico-vétérinaire et épizoo-

(3) En outre, Friess a fait, à la séance de mars 1946 de la Société médicale des Hôpitaux d'Alger, une communication sur une épidémie familiale de distomatose hépatique.

tique de l'incident a été considéré par notre collègue Daulouede, directeur de l'abattoir de Bayonne (*loc. cit.*).

Une épidémie familiale de distomatose ayant atteint six personnes et révélatrice d'un foyer actif de contamination, a été dépistée, en 1955, aux environs de Pau, par Aris, Deschiens, Duizabo, Flye-Sainte-Marie, Lapeyre et Sauchet [13].

Enfin, de petits foyers existent en Haute-Garonne et Izard, Mazières et Pons [14] ont, autrefois, signalé 12 cas d'hépatite sub-aiguë, dans la région toulousaine, qui se rattachaient sûrement à la distomatose.

Aux cas publiés — toujours pour le Sud de la Loire — nous ajouterons ceux qui ont été portés à notre connaissance par différents confrères et par les examens copro-parasitologiques et sérologiques que nous avons pratiqués en 1956. Ils concernent la Corrèze (foyers dans la région de Brives), l'Allier, la Saône-et-Loire, l'Aveyron et les Basses-Pyrénées.

*Nord de la Loire.* — D'Allaines, Lavier et Gandrille, en 1942 [15] ont relaté une petite épidémie chez trois femmes infestées au cours d'un séjour dans une pension de famille de la Baule (Loire-Inférieure).

Michon, Heully, Dornier, Larcan, Huriet et Peters [16], en 1957, ont étudié deux observations de distomatose à *Fasciola hepatica* contractées l'une dans la région de Rambervillers (Vosges), l'autre dans la Haute-Saône.

Kissel [17], en mars 1957, a présenté, à l'Académie de Médecine, une communication relative à de nombreux cas de distomatose hépatique observée en Lorraine. Sa communication a reçu une audience légitime et l'Académie de Médecine a désigné, sur l'initiative de G. Lavier, une commission chargée de l'étude des moyens prophylactiques à appliquer pour lutter contre la distomatose humaine.

Nous portons à votre connaissance que nous avons identifié, à l'occasion soit d'examens copro-parasitologiques, soit d'examens sérologiques, soit de communications médicales, les territoires (départements) d'infestation suivants au Nord de la Loire : Calvados (Caen), Mayenne (Andouillé), Finistère (Quimper), Loire-Inférieure, Meurthe-et-Moselle, Vosges, Haute-Saône, Haute-Marne, Doubs, Nièvre, Côte-d'Or, Ain, Saône-et-Loire.

Cet exposé montre que si la majorité des épidémies de distomatose signalées en France intéresse les régions situées au sud de la Loire et, singulièrement, le Massif Central, la région lyonnaise, les Dombes, les Landes, l'Aveyron, le Béarn, le Pays basque et la Haute-Garonne, les régions situées au nord de la Loire sont, elles aussi, affectées par la maladie ; celle-ci intéresse donc pratiquement toute la France.

La petite douve *D. dendriticum* est, surtout, un parasite des voies biliaires du mouton qui semble n'infester l'homme qu'exceptionnellement. Son cycle évolutif comporte, comme hôte intermédiaire, un mollusque terrestre qui est un escargot du genre *Zebrina* (*Z. dedrita*) ; les cercaires sont rejetées par paquets (pseudo-kystes) dans le milieu extérieur, avec les sécrétions muqueuses de l'escargot ; ces pseudo-kystes sont déposés à la surface humide des végétaux ; ingérées par des fourmis (*Formica fusca*, *F. rufibarbus*), les cercaires se transforment chez l'insecte en métacercaires infectieuses. L'herbivore s'infecte en avalant des fourmis avec l'herbe [18]. Cette circonstance épidémiologique explique l'extrême rareté de l'infestation humaine qui ne s'acquiert que par la consommation éventuelle de crudités ou de fruits tombés et envahis par des fourmis.

Cent cas, environ, de distomatose hépatique humaine à *D. dendriticum* sont relevés dans la littérature mondiale. En France, 5 cas, seulement, semblent avoir été identifiés, un par Galavielle et Bousquet, en 1923 ; un par Sigalais et Pirot, en 1924 ; deux par Deschiens et Lamy, en 1948 et 1950 ; un par Siguier, en 1952 (4). On doit considérer que l'infection humaine par la petite douve est tout à fait exceptionnelle.

Cette revue de la dispersion géographique des épidémies et des cas de distomatose signalés en France pendant les dix dernières années, montre que la maladie est active et qu'elle pose des problèmes diagnostiques, prophylactiques et thérapeutiques qui doivent retenir l'attention des médecins et des hygiénistes.

La répartition des cas de distomatose hépatique humaine en France, de 1946 à 1956, est indiquée dans la carte annexée à ce mémoire. Elle intéresse les départements suivants : Nord, Calvados, Mayenne, Finistère, Loire-Maritime, Meurthe-et-Moselle, Vosges, Haute-Saône, Haute-Marne, Doubs, Nièvre, Côte-d'Or, Saône-et-Loire, Ain, Puy-de-Dôme, Corrèze, Rhône, Loire, Landes, Basses-Pyrénées, Aveyron, Haute-Garonne, Hérault, Bouches-du-Rhône.

## SYMPTOMATOLOGIE

### PREMIÈRE PHASE D'INVASION HÉPATIQUE.

Le début se fait, quinze jours environ après le repas infestant, par des troubles peu caractéristiques : lourdeur au creux épigastrique, avec, parfois, crises douloureuses plus nettes, sans relation avec les repas, asthénie rapidement progressive, signe très

(4) Une réserve est à faire, celle de la présence possible d'œufs de douves, en transit, résultant de la consommation alimentaire de foies douvés.

précoce et qui va durer longtemps ; le foie devient douloureux non seulement à la pression, mais spontanément avec, par moment, des irradiations vers l'épaule droite. La fièvre apparaît bientôt, s'installant par clochers vespéraux dont l'amplitude

**Carte de répartition  
de la distomatose hépatique humaine en France (1957).**  
En grisé, foyers de distomatose hépatique humaine.



augmente quotidiennement jusqu'à prendre une allure d'hecticité ; elle est accompagnée d'accélération du pouls et de crises sudorales dont l'abondance, comparable à celle de la mélitococcie, sait attirer l'attention. Un amaigrissement progressif s'observe ; il y a, parfois, des myalgies (à la nuque surtout) ou des douleurs rhumatoïdes polyarticulaires.

A cette période, l'aspect du malade est typiquement celui d'un

infecté, amaigri, asthénique, à peau sèche et blafarde, parfois légèrement subictérique, à foie douloureux, hypertrophié, présentant, à l'examen radiologique, une élévation nette de l'hémi-diaphragme droit, parfois même un épanchement pleural droit ; il existe, souvent, une toux d'irritation sèche et pénible. La rate s'est montrée quelquefois augmentée de volume, mais ce n'est pas la règle ; dans certains cas, on a noté une ascite légère, dans d'autres une adénite cervicale ou axillaire. L'examen systématique ne révèle rien de bien typique, sauf celui du sang, qui donne toujours, alors, une hyperleucocytose très nette (de 13 000 à 35 000 leucocytes et plus) portant presque exclusivement sur les éosinophiles qui atteignent des taux de 59 à 80 p. 100 et au delà. Cette constatation déterminant, en général, une recherche de parasites et, tout particulièrement, un examen des selles, il est bon d'insister sur le fait que celui-ci restera alors *toujours négatif*, en ce qui concerne les œufs de douves, puisque celles-ci ne sont pas encore adultes.

Il va sans dire que l'intensité et la richesse de la symptomatologie, à ce moment, dépendront du nombre de parasites ingérés : avec une infestation forte, on peut avoir ainsi des états extrêmement alarmants à allure de septicémie, ou d'abcès sous-phréniques, ou des états pseudo-typohïdiques ; à l'opposé, il peut y avoir des infections légères se traduisant par un tableau banal et épisodique d'embarras gastrique avec légère poussée fébrile.

La durée de cette phase d'invasion dépend, en effet, également, de l'intensité de l'infection. Si l'état fébrile est court, quand celle-ci est faible, il peut, par contre, persister pendant trois à quatre mois dans les cas sévères. Après quoi, les oscillations thermiques s'amortissent progressivement ; l'état général s'améliore, les douleurs s'atténuent et même peuvent disparaître ; le malade reprend du poids, mais lentement et il accuse toujours une asthénie considérable qui constitue alors son principal souci. Bien que se sentant très amélioré, il a la sensation nette qu'il n'est pas guéri. Le sang, à ce moment, révèle encore une hyperleucocytose, mais bien plus modérée qu'auparavant ; elle est toujours constituée surtout par les éosinophiles, mais les taux de ceux-ci sont en décroissance.

#### DEUXIÈME PHASE D'INVASION HÉPATIQUE.

*Les parasites sont dans les voies biliaires.*

Le malade est entré, ainsi, insensiblement dans la deuxième phase de la maladie. Les vers sont alors dans les voies biliaires ; devenus adultes, leurs œufs pourront être reconnus, leur présence alors ne se révélera que par deux actions bien différentes : la

première est une action toxique ; c'est elle qui va continuer à produire cette asthénie qui, nous le répétons, est la principale plainte du malade ; elle se révèle aussi par une anémie constante mais légère (rarement moins de 4 millions de globules rouges) ; le taux des leucocytes est revenu à la normale, celui des éosinophiles a baissé et continue insensiblement à baisser avec le temps, mais sans jamais retomber à la normale (5 à 6 p. 100, après dix ans d'infestation). Des migraines, des poussées d'urticaire allant parfois jusqu'à la maladie de Quincke traduisent la sensibilisation aux substances toxiques vermineuses, l'anorexie persiste, en général, avec une sensation de lourdeur au creux épigastrique. La deuxième modalité de l'action de présence se manifeste du côté des voies biliaires : coliques hépatiques non différenciables de celles produites par la migration d'un calcul et cela d'autant plus que la présence des vers est aussi un facteur de lithiasite vraie.

Des crises d'occlusion peuvent être ainsi déterminées et l'infection, à peu près constante en ce cas, des voies biliaires, pourra alors déterminer des phénomènes septiques.

En fait, à cette période, les malades sont des pseudo-lithiasiques et, bien des fois, le diagnostic étiologique réel n'a été fait qu'à l'intervention chirurgicale.

Mais il peut y avoir, parfois, une latence très grande et l'infestation ne sera révélée que fortuitement à l'occasion d'un examen coprologique fait pour toute autre cause.

La durée de l'infestation, chez l'homme, peut être fort longue. Bürgi a vu un cas datant de trois années ; Lavier en a vu trois datant de dix ans.

#### FORMES CLINIQUES.

Diverses formes cliniques ont été séparées (Morenas, Garin, M. Loeper, Schneider) [19].

Nous pensons que le meilleur classement conduit à distinguer les formes suivantes, en tenant compte du facteur chronologique fort important et de la modalité clinique :

1° *Formes d'invasion hépatique* : ce sont sensiblement les formes générales de M. Loeper ; selon leur intensité, elles prennent les aspects suivants : a) éosinophilie fébrile ; b) hépatite éosinophile ; c) forme pseudo-typhoïdique (Garin, Morenas) ; d) forme pseudo-septicémique.

2° *Formes du parasitisme bilaire* : a) forme pseudo-lithiasique (Garin) ; b) forme angiocholitique (Garin) ; c) forme entérocolitique (M. Loeper).

## DIAGNOSTIC

Nous n'insisterons pas sur le diagnostic différentiel qui est facile à déduire du tableau des formes cliniques précédent, mais sur le diagnostic positif.

Celui-ci sera fait sur la mise en évidence des œufs. Cependant : 1° les œufs n'apparaissent pas avant la fin du troisième ou le début du quatrième mois ; 2° l'alimentation (foie de mouton douvé) peut apporter des œufs en transit, d'où cause possible d'erreur. On l'évitera en faisant porter la recherche non sur les selles, mais sur le liquide de tubage duodénal, matériel bien plus favorable que les selles à l'examen microscopique.

Avant l'apparition des œufs (quatrième mois), c'est l'examen hématologique qui donne la présomption la plus forte.

Une hépatite fébrile, un état toxi-infectieux, une fièvre avec une forte hyperéosinophilie offrent un caractère tout à fait insolite (l'infection fébrile réduit expérimentalement l'hyperéosinophilie) qui n'est réalisée que dans la distomatose à grande douve et dans la bilharziose à *Schistosoma mansoni* ; l'argument géographique interviendra pour la discrimination entre ces deux parasitoses.

La cuti-réaction et, surtout, l'intradermo-réaction à l'antigène distomien (antigène lyophilisé de l'Institut Pasteur, en particulier) se montrent *pratiquement spécifiques* : il en est de même de la réaction de déviation du complément appliquée avec les mêmes antigènes suivant la technique de Calmette et Massol ou suivant la technique de Kolmer. Les réactions peuvent devenir positives chez les malades atteints de distomatose bien avant le troisième mois ; elles précèdent donc l'apparition des œufs dans les selles et permettent de faire un diagnostic relativement précoce de la maladie. Elles sont d'autant plus précieuses au diagnostic pratique que la distomatose hépatique est beaucoup plus facile à guérir à la phase d'invasion qu'à la période d'état.

## PRONOSTIC

Le pronostic de la distomatose due à la grande douve n'est pas mauvais, en ce sens que la mortalité est faible. Cependant, l'infection peut durer longtemps, entraînant un état d'asthénie prolongée, avec épisodes douloureux intermittents.

En outre, il y a toujours à craindre la possibilité d'un épisode aigu : angiocholécystite purulente ou occlusion des voies biliaires mettant la vie en danger si l'on n'intervient pas chirurgicalement.

Dans bien des cas où l'infestation a été faible, les quelques

vers installés dans les voies biliaires seront éliminés progressivement et la guérison surviendra spontanément en un temps plus ou moins long.

Il est assez délicat d'évaluer si la guérison est entière ou non : en effet, à la fin de l'infection, les œufs deviennent très rares, si bien qu'un examen négatif ne permet pas, à lui seul, d'affirmer l'extinction ; il faudra donc multiplier leur recherche, ainsi que les examens de sang ; l'éosinophilie, en effet, s'abaisse progressivement et, peut-être, est-elle encore supérieure à la normale après que le dernier parasite a disparu. La persistance de réactions immunologiques positives peut être indicative.

Le pronostic est d'autant meilleur que le traitement par le chlorhydrate d'émétine est fait précocement, la guérison, sous l'influence de cette médication, à la période d'invasion, est la règle. La guérison spontanée dans les cas de pauci-infestation est possible, mais il est prudent de ne pas compter sur elle.

### TRAITEMENT

Il est très important de souligner que la distomatose hépatique est d'autant plus curable qu'elle est récente ; cette donnée fait ressortir l'intérêt d'un diagnostic précoce.

Le traitement spécifique de la distomatose à *F. hepatica* reste encore à trouver. Cependant, dans la période d'hépatite du début de la maladie, la médication qui s'impose en raison de son efficacité est le chlorhydrate d'émétine introduit dans la thérapeutique de la distomatose par Kouri, en 1935. La posologie adoptée doit être forte : 4 à 8 cg quotidiens, en injections intramusculaires, pendant huit à dix jours consécutifs (une ou deux séries avec repos intercalaires) sont recommandables. Le traitement amène rapidement la sédation des douleurs, la chute de la fièvre et l'amélioration de l'état général ; la récession de l'hyperéosinophilie se fait plus lentement, et, dans les cas de guérison, ce qui est la règle, lorsque le traitement intervient avant le troisième mois, elle se résout en trois semaines à un mois.

*Lorsque les vers sont installés dans les voies biliaires* et que les œufs sont apparus dans les selles, c'est-à-dire après le troisième mois, l'activité du chlorhydrate d'émétine est beaucoup plus faible. On doit alors multiplier patiemment les séries d'injections pour tenter d'obtenir un résultat favorable qui, d'ailleurs, n'est pas assuré.

L'extrait éthétré de fougère mâle qui, à fortes doses, se montre efficace dans la distomatose des ruminants (Raillet, Moussu et Henry, 1911) n'a donné, chez l'homme, que des résultats inégaux

(Guilart, Senevet, Giordano et Gelli, Goutelen et Audoin); il est vrai que la posologie utilisable, chez celui-ci, ne peut être comparée à celle que tolèrent les animaux.

Le tétrachlorure de carbone est actif; il a été employé par Kouri et par Meersmann (deux cures de cinq jours, chacune, de 1 cm<sup>3</sup> par jour), mais les doses thérapeutiques sont voisines de la dose toxique.

Le thymol a été conseillé, il est d'activité douteuse.

Les antimoniaux (émétique, stibosan, fouadine, anthiomaline, glucantime) connaissent des succès et des échecs. Le N.méthyl-glucamine (glucantime), dérivé pentavalent de l'antimoine, dont la tolérance est variable, semble offrir, en injections intramusculaires, une certaine activité; il a donné à certains auteurs et, en particulier, à Sédallian, Maral et Perrin (*loc. cit.*), à Blanchard, Coudert et Buffard (1949) [20] des résultats favorables. La posologie, chez l'adulte, est de 0,10 g par kilogramme de poids et par jour, pratiquement 3 ampoules de 5 cm<sup>3</sup> (dosées à 1,50 g), soit 4,50 g par jour, pendant dix à quinze jours; une à deux séries avec repos médicamenteux intercalaire. Cependant, la médication doit être appliquée prudemment; Brouet, Marche et Leprat (1951) [*loc. cit.*] ont signalé des intolérances qui ont imposé la cessation prématurée de la cure.

Les arsenicaux, en particulier le novarsénobenzol et le dérivé acétyle de l'acide oxyaminophénylarsinique (stovarsol), ont été préconisés [Senevet (1928), Coutelen (1931), Heckenroth et Advier (1931)], ils réduisent, en tout cas, le nombre des œufs.

Parmi les colorants, le *violet de gentiane*, en injections intraveineuses (solution à 1 p. 100), suivant la méthode de Faust (première dose de 20 cm<sup>3</sup> suivie d'une deuxième dose de 30 cm<sup>3</sup>. trois jours après), a été appliqué par Costa Maudry, à Porto-Rico. Le *rouge de Magdala* en solution à 1 p. 100 a été utilisé par Livièvre (1934), en injections intraveineuses.

Les sels d'étain (oxyde stanneux, hydroxyde d'étain, chlorure stanneux) qui se montrent actifs dans la bilharziose intestinale à *Schistosoma mansoni*, autre infestation à trématode (Deschiens, 1951 [21]; Mauzé et Arnaud, 1954 [22]; Bellon, 1955 [23]), sont en cours d'application dans le traitement de la distomose hépatique humaine, sans que des conclusions valables puissent encore être posées.

Les cholagogues (calomel, boldo, sel de seignette, tartrate double de potasse et de soude) et le drainage continu par sonde duodénale ont une action auxiliaire favorable (Gaide et Léger, Railliet, Moussu et Henry, G. Lavier).

L'anémie doit être combattue et l'état général remonté.

## PROPHYLAXIE

La prophylaxie de la distomatose hépatique humaine comporte plusieurs orientations :

*La réglementation de la culture et de la vente du cresson.* — Tout cresson qui n'est pas un cresson de culture est un cresson dangereux qui ne devra pas être livré à la consommation. On recommandera donc d'éviter l'usage alimentaire du cresson sauvage et de tout cresson cultivé ne comportant pas des aménagements de protection contre les incursions d'animaux domestiques (moutons et bovins, en particulier) pouvant être atteints de distomatose.

Nous appelons l'attention sur le fait que, sauf information nouvelle, la cressiculture vraie n'existe, actuellement, que dans l'Ile de France et dans la région de Lyon.

Nous proposons, en conséquence, que des arrêtés réglementant la production et la vente du cresson soient pris et appliqués.

*Les mesures de protection des cressonnères vis-à-vis du bétail contaminateur.* — Les animaux habituellement contaminateurs, moutons et bovins, sont nécessairement amenés à boire dans les points d'eau naturels ou aménagés par l'homme (sources, ruisseaux, canaux, mares, étangs) qu'ils rencontrent dans leurs déplacements et dans lesquels ils défèquent occasionnellement. Cette circonstance est inévitable sur le plan rural et échappe à toute réglementation.

C'est donc dans le sens de la mise hors d'atteinte des points d'eau, où se développe le cresson utilisé dans la consommation, par le bétail et par ses déjections (fumiers), qu'une protection peut s'exercer.

Le périmètre des sources ou des biefs d'amont des cressonnères cultivées ou naturelles peut être protégé par des grillages, des pieux ou des palissades contre les incursions du bétail, les dépenses légères engagées dans ce but seraient facilement compensées par les profits de la vente du cresson.

Dans le cas des cressonnères situées dans des biefs de ruisseaux ou des dolines, il est évident que l'amont du système d'eau devra être protégé contre une contamination éventuelle, afin que l'écoulement naturel de l'eau n'entraîne pas une souillure à distance.

Le risque de contamination par les animaux sauvages (cerfs, sangliers, chevreuils, bouquetins, chamois, isards, lièvres, lapins), s'il demande, dans certains cas, à être considéré, est pratiquement nul. Nous proposons une réglementation concernant le périmètre de protection et l'aménagement des cressonnères cultivées ou des

cressonnières naturelles, auxquelles les populations régionales s'approvisionnent habituellement.

*Les mesures relatives à la déparasitisation des animaux domestiques contaminateurs* sont limitantes des possibilités d'infestations humaines, elles seront examinées et discutées par notre collègue, le Dr Rossi.

Les actions *molluscocides* chimiques (sulfate de cuivre, pentachlorophénates) vis-à-vis des limnées, hôtes intermédiaires aquatiques de *F. hepatica*, onéreuses et peu opérantes, auraient des conséquences économiques et touristiques fâcheuses sur la flore, la faune et la potabilité humaine et animale des collections d'eaux naturelles ou domestiquées.

Les actions *molluscocides* sur les escargots (*Zebrina*), vecteurs de *D. dendriticum*, ne sont pas à considérer en raison de la dispersion illimitée des escargots terrestres, hôtes intermédiaires de la petite douve, et de l'extrême rareté de l'infestation de l'homme par ce trématode.

### RÉSUMÉ

Les distomatoses hépatiques, maladies parasitaires dues à l'infestation des voies biliaires par *Fasciola hepatica*, sont beaucoup plus fréquentes qu'on ne l'a cru longtemps. Les infestations par la petite douve, *Dicrocoelium dendriticum*, sont exceptionnelles.

Les provinces françaises où la distomatose sévit plus particulièrement sont situées au Sud de la Loire ; le Lyonnais, les Dombes, le Massif Central et le Sud-Ouest sont les régions où la maladie est signalée avec le plus de fréquence. Cependant, des contaminations humaines existent aussi au Nord de la Loire, particulièrement en Flandre, en Lorraine, en Franche-Comté, en Normandie, en Mayenne et en Bretagne.

Une carte des répartitions des distomatoses hépatiques en France est donnée. Les principales épidémies signalées de 1942 à 1957 sont relevées.

Le schéma symptomatologique de la phase d'invasion hépatique, puis de l'invasion — généralement après deux à trois mois environ — des voies biliaires, par les parasites est rappelé, ainsi que les formes cliniques de la maladie.

Le diagnostic positif se fonde avant le troisième mois (avant l'apparition des œufs) : 1<sup>o</sup> sur un syndrome hépatique fébrile avec un état toxico-infectieux ; 2<sup>o</sup> sur une hyperéosinophilie forte et insolite (l'état fébrile réduit, habituellement, l'hyperéosinophilie) ; 3<sup>o</sup> sur la cuti-réaction et, surtout, l'intradermo-réaction à l'antigène distomien et la réaction de déviation de complément.

Après l'apparition des œufs (troisième ou quatrième mois),

l'examen coprologique permet de dépister la maladie conjointement à l'intradermo-réaction.

Il est important de faire le diagnostic précocement (avant le troisième mois), la maladie étant alors plus curable que par la suite.

Le traitement qui s'impose est l'utilisation de chlorhydrate d'émetine suivant une posologie comparable à celle de l'amibiase.

La prophylaxie portera essentiellement sur la réglementation de la culture et de la vente du cresson et sur les mesures de protection des cressonniers vis-à-vis du bétail ou des animaux sauvages contaminateurs.

## SUMMARY

### HUMAN HEPATIC DISTOMATOSIS IN FRANCE.

Hepatic distomatosis is a parasitic disease due to the invasion of biliary ducts by *Fasciola hepatica*. It is much more common than was formerly thought. Infections by the small fluke *Dicrocælium dendriticum* are exceptional.

The French regions where distomatosis prevails are situated at the south of the Loire. It is in the Lyonnais, the Dombes, the central mountainous and south-western regions that the disease is most often diagnosed.

However human contaminations do exist at the north of the Loire, especially in Flanders, Lorraine, Franche-Comté, Normandy, Mayenne, Brittany.

The author publishes a map representing the distribution of hepatic distomatosis in France. The main epidemics described from 1942 to 1957 are pointed out.

The symptomatologic scheme of hepatic invasion, of the invasion of biliary ducts (generally two to three months later) by the parasite, and the different clinical pictures are described.

A positive diagnosis is based, before the third month (e. g. before the appearance of the eggs) :

1° On an hepatic febrile syndrome with a toxi-infectious condition ;

2° On a high and unusual eosinophily (the fever usually reduces eosinophily) ;

3° On the cuti-reaction and particularly on the intradermal reaction with a Distoma antigen, and on the complement fixation reaction.

After the appearance of eggs (third-fourth month) a stool examination allows, simultaneously with the intradermal reaction, to demonstrate the infection.

An early diagnosis of the disease (before the third month) is important, because the infection is then more easily curable than later.

The best therapy is the administration of emetin chlorhydrate, the dosage being about the same as in amoebiasis.

As prophylactic measures, the culture and sale of cress should be controlled, and watercressbeds protected against contamination by cattle or wild animals.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAVIER (G.). *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 1950, article n° 7029.
- [2] DAULOUDE (P.). *Bull. Soc. méd. Pays basque*, 1954, **7**, 76.
- [3] GARIN (Ch.). *Lyon méd.*, 1939, **163**, 317.
- [4] BÜRGİ (K.). *Mitteil. Grenzgeb. Med. Chir.*, 1936, **44**, 488.
- [5] GRIFFITHS, VAURS, PERROT et MAZEN, in VAURS (R.) et BERNARD-GRIFFITHS. *Rev. Méd. vétér. Lyon-Tooulouse*, juillet-août 1943.
- [6] BOUYSSET, JOINAUX et PHILIPPE. *Lyon méd.*, 1943, **170**, 417.
- [7] SÉDALLIAN (P.), MARAL (R.) et PERRIN (A.). *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1949, **65**, 327.
- [8] COUDERT (J.) et TRIOZON (F.). *Presse méd.*, 1957, **65**, 1586.
- [9] BROUET (G.), MARCHE (J.) et LEPRAT (J.). *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1951, **67**, 33.
- [10] MERCIER DES ROCHETTES, LHOSMOT, LESCA et SOUCHARD. *Bull. Soc. méd. Pays basque*, 1954, **7**, 55.
- [11] LESCA (H.) et PEINAUD (G.). *Bull. Soc. méd. Pays basque*, 1954, **7**, 65.
- [12] LEMOINE (J.) et GABARRA (J.). *Bull. Soc. méd. Pays basque*, 1954, **7**, 70.
- [13] ARIS, DESCHIENS (R.), DUIZABO, FLYE SAINTE-MARIE (E.), LAPEYRE et SAUCHET. *Presse méd.*, 1956, **64**, 265.
- [14] IZARD, MAZIÈRES et PONS. *Paris méd.*, 1933, **23**, 233.
- [15] ALLAINES (F. d'), LAVIER (G.) et GANDRILLE. *Presse méd.*, 1942, **50**, 738.
- [16] MICHON (P.), HEULLY (F.), DORNIER (R.), LARCAN (A.), HURIET (C.) et PETERS (A.). *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1957, **73**, 215.
- [17] KISSEL (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1957, **141**, 231.
- [18] VOGEL (H.) et FALCAO (J.). *Z. Tropenmed.*, 1954, **5**, 275.
- [19] SCHNEIDER (J.). *Rev. Praticien*, 1954, **4**, 2127.
- [20] BLANCHARD (H.), COUDERT (J.) et BUFFARD. *Lyon méd.*, 1949, **182**, 358.
- [21] DESCHIENS (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1951, **44**, 657.
- [22] MAUZÉ (J.) et ARNAUD (G.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 77.  
Discussions DESCHIENS (R.), LAMY (L.) et MONTEL (M.-L.-R.), 1954, **47**, 79.
- [23] BELLON (J.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955, **48**, 197.

## LA DÉSPÉCIFICATION DU SÉRUM SANGUIN

par J. LOISELEUR (\*).

(*Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique*)

La déspecification du sérum sanguin a été recherchée dans le but de supprimer son antigénicité et de pouvoir substituer dans certaines applications thérapeutiques, au sérum humain, un sérum d'origine quelconque, le sérum de bœuf par exemple.

Si, comme il est admis actuellement, l'antigénicité repose sur la distribution spatiale d'un nombre défini de groupes fonctionnels libres, acides ou basiques, la disparition de l'antigénicité — c'est-à-dire la déspecification — exige l'élimination totale de ces groupes acides et basiques.

On sait déjà que le simple chauffage du sérum entraîne une combinaison réciproque d'un certain nombre de groupes acides et de groupes basiques : toutefois, le nombre des groupes ainsi éliminés est trop restreint pour que le chauffage puisse être retenu comme agent de déspecification. Il en est de même pour le formol qui n'intéresse que les groupes — NH<sub>2</sub>, en laissant inchangés les groupes acides.

La diazotation, combinée avec un chauffage postérieur, transforme les groupes basiques en groupes alcooliques ou phénoliques — OH, lesquels peuvent à leur tour se combiner avec les groupes acides, en entraînant un degré plus marqué de déspecification.

Malgré tous ces traitements, le sérum conserve néanmoins un pouvoir antigénique qui s'oppose à son utilisation clinique.

**I. RAPPEL DE NOTIONS ANTÉRIEURES.** — L'étude de ce problème est facilitée par la mesure conductimétrique [1] du nombre des groupes libres, ce qui permet de suivre, par une méthode plus rapide que l'essai sur l'animal, l'effet des divers traitements imposés au sérum. Comme cette méthode va être utilisée constamment, il convient de rappeler quelques définitions.

(\*) Manuscrit reçu le 21 octobre 1957.

*Poids équivalent.* — C'est le poids du protéide qui est susceptible de se combiner à 1 000 cm<sup>3</sup> de NaOH N (poids équivalent acide ou  $pe_A$ ) ou à 1 000 cm<sup>3</sup> de HCl N (poids équivalent basique ou  $pe_B$ ).

*Nombre total de groupes libres présents dans la molécule protéique.* — Cette valeur est obtenue en divisant le poids moléculaire PM par le poids équivalent correspondant. Dans le cas d'un protéide pur, le nombre  $n_A$  des groupes libres acides est :

$$n_A = \frac{PM}{pe_A}$$

De même, le nombre des groupes libres basiques est :

$$n_B = \frac{PM}{pe_B}$$

Dans le cas du sérum qui est constitué par une association de protéides de constitutions et de poids moléculaires différents, le poids moléculaire peut être représenté par  $\Sigma n . PM$ . Les formules précédentes deviennent :

$$n_A = \frac{I}{pe_A} \cdot \Sigma n . PM \quad n_B = \frac{I}{pe_B} \cdot \Sigma n . PM$$

*Nombre de groupes libres présents dans 1 g de protéides sériques.* — Il est très facile d'éliminer le facteur inconnu  $\Sigma n . PM$ . Il suffit, pour cela, de ramener les calculs au nombre des groupes présents dans 1 g de protéides sériques. En effet, les expressions précédentes deviennent :

$$n'_A = \frac{I}{\Sigma n . PM} \cdot \frac{I}{pe_A} \cdot \Sigma n . PM = \frac{I}{pe_A}$$

$$n'_B = \frac{I}{\Sigma n . PM} \cdot \frac{I}{pe_B} \cdot \Sigma n . PM = \frac{I}{pe_B}$$

Or,  $pe_A$  et  $pe_B$  sont facilement mesurables par la méthode conductimétrique, avec la précision de 4 p. 100.

*Déspecification et facteur d'antigénicité.* — Si les groupes libres sont responsables de l'antigénicité, cette dernière peut être représentée par un facteur  $\alpha$  qui est la somme des groupes libres acides et basiques :

$$\alpha = n'_A + n'_B$$

La mesure de  $\alpha$  permet ainsi de connaître rapidement par un simple titrage, l'effet d'un traitement imposé au sérum pour obtenir sa déspecification.

Pour un sérum normal, la valeur de  $\alpha$  est comprise entre  $2,60 \cdot 10^{-3}$  et  $2,80 \cdot 10^{-3}$  pour le sérum de cheval et entre  $2,54 \cdot 10^{-3}$  et  $2,80 \cdot 10^{-3}$  pour le sérum de bœuf.

**II. LES PROCÉDÉS DE DÉSPÉCIFICATION ET LEURS EFFETS SUR L'ANTIGÉNICITÉ.** — Plusieurs procédés entraînent un degré plus ou moins élevé de déspecification : le chauffage, le formol, le diazométhane et la diazotation.

a) *Action du chauffage.* — Cette action a déjà été exposée ; il suffit d'en rappeler brièvement les résultats [2].

*Sérum normal.* — Si l'on chauffe progressivement un sérum, on constate une baisse régulière et simultanée des groupes acides et des groupes basiques. Cette baisse atteint sa plus forte valeur vers  $52^{\circ}$ - $54^{\circ}$ . Le tableau I reproduit les valeurs expérimentales.

TABLEAU I.

	Groupes acides ■ A	Groupes basiques ■ B	Antigénicité $\alpha$
Sérum (Cheval) normal.....	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$2,78 \cdot 10^{-3}$
" chauffé à $52^{\circ}$ .....	$1,04 \cdot 3$	$0,99 \cdot "$	$2,03 \cdot "$
" dialysé et chauffé à $95^{\circ}$	$0,51 \cdot "$	$0,51 \cdot "$	$1,02 \cdot "$
" soumis aux ultra-sons..	$1,47 \cdot "$	$1,54 \cdot "$	$3,01 \cdot "$

*Sérum dialysé.* — En éliminant les électrolytes par dialyse, le sérum peut être chauffé à  $100^{\circ}$ . La baisse des groupes libres devient encore plus importante : il en résulte pour l'antigénicité une diminution très marquée (36,6 p. 100).

Qu'il s'agisse du sérum normal ou du sérum dialysé, l'action remarquable de la chaleur consiste dans la diminution, parallèle et sensiblement du même ordre, des groupes acides et des groupes basiques. Cette diminution peut être interprétée comme le résultat d'une réaction de condensation entre les différentes protéines constitutives ( $R$ ,  $R'$ ...) du sérum, par l'intermédiaire de leurs groupes libres :



A l'appui de cette interprétation, on peut remarquer qu'elle cadre avec la diminution progressive des groupes libres à mesure que la température s'élève. Elle explique aussi l'augmentation de la viscosité du sérum chauffé. Enfin, autre argument indirect : les ultra-sons exercent un effet opposé à celui de la chaleur. Ils augmentent le nombre des groupes libres, ce qui résulte évidemment de la dispersion imposée au sérum.

b) *Actions combinées du chauffage et du formol.* — Le formol réagit facilement avec les groupes aminés des protéines et peut entraîner, quand le tryptophane est intéressé par la réaction, une modification de structure et une dénaturation complexe et irréversible, du genre de celle qui transforme les toxines en anatoxines [3]. Aussi n'est-il pas étonnant que le formol soit utilisé dans plusieurs des procédés proposés pour déspécifier le sérum (Massons [4], Edwards [5], Mérieux [6], Dujarric de la Rivière [7]).

Pour se trouver dans les conditions les plus favorables, les données expérimentales ont été exagérées : le sérum est chauffé à 100°, à reflux, en présence de 10 p. 100 de formol et à pH = 9. On constate une diminution des groupes basiques et des groupes acides, cette dernière diminution pouvant provenir de la condensation des protéides sériques sous l'influence du formol (tableau II).

TABLEAU II.

	groupes acides n° A	groupes basiques n° B	ANTIGENICITÉ
Sérum normal (boeuf)	$1,23 \cdot 10^{-5}$	$1,37 \cdot 10^{-5}$	$2,60 \cdot 10^{-5}$
" chauffé à 100° pen- dant 1 heure, avec 10% de formol	0,73. "	0,59. "	1,32. "
" chauffé à 100° pen- dant 1 heure, avec 10% de glyoxal	0,74. "	0,62. "	1,36. "

On constate que la diminution de l'antigénicité α est moins importante en présence du formol ou du glyoxal que par le seul chauffage.

c) *Action du diazométhane.* — Le diazométhane, préparé par saponification de la nitrosométhylurée (1), a été expérimenté sous forme de solution éthérée. Immédiatement après sa préparation, la solution est agitée avec le sérum : il se produit aussitôt un violent dégagement d'azote. Le mélange est abandonné pendant vingt-quatre heures. Le lendemain, on décante la couche éthérée et on filtre.

A priori, le diazométhane constitue un réactif intéressant pour la déspécification, puisqu'il est susceptible de réagir à basse température sur les groupes phénoliques et sur les groupes carboxyliques, en les acétylant :



(1) M. Funk a bien voulu se charger de cette préparation, au Service de Chimie thérapeutique.

Agité avec le sérum, le diazométhane entraîne la diminution des groupes acides. Cette action est proportionnelle à la quantité de diazométhane (tableau III) ; l'expérience est faite en ajoutant, à 100 cm<sup>3</sup> de sérum, des quantités croissantes d'une solution éthérée contenant 4 à 5 p. 100 de diazométhane.

On constate, sur le tableau III, que les groupes basiques pré-

TABLEAU III.

Solution de CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> dans 100 cm <sup>3</sup> de Sérum	Groupes acides $n_A^*$	Groupes basiques $n_B^*$	Antigénicité $\alpha$
0	1,39.10 <sup>-3</sup>	1,39.10 <sup>-3</sup>	2,78.10 <sup>-3</sup>
10 cm <sup>3</sup>	1,30. "	1,18. "	2,48. "
25 "	1,15. "	1,26. "	2,41. "
50 "	0,98. "	1,30. "	2,28. "

sentent une légère diminution, surtout pour les faibles concentrations du réactif ; au contraire, les groupes acides présentent une diminution proportionnelle à la quantité de diazométhane. Néanmoins, l'abaissement de l'antigénicité reste faible.

La diazotation conduit à un résultat plus satisfaisant.

d) *Action de la diazotation.* — L'emploi de l'acide nitreux présente un double avantage. Il entraîne d'abord la désamination totale et irréversible, en transformant les groupes —NH<sub>2</sub> en groupes —OH, alcooliques ou phénoliques selon le cas. D'autre part, la diazotation, combinée avec le chauffage, entraîne l'élimination d'une proportion élevée (75 à 80 p. 100) de groupes acides (tableau IV) :

TABLEAU IV.

	Groupes acides $n_A^*$	Groupes basiques $n_B^*$	Antigénicité $\alpha$
Sérum normal (Boeuf)....	1,40.10 <sup>-3</sup>	1,40.10 <sup>-3</sup>	2,80.10 <sup>-3</sup>
" diazoté et chauffé..	0,31. "	0	0,31. "

Voici d'abord la technique détaillée de la préparation. 15 g de NO<sub>2</sub>K sont dissous dans 200 cm<sup>3</sup> de sérum de bœuf. La solution est introduite dans un bêcher de 2 l, lequel est placé dans un cristallisoir garni d'un mélange de glace et de sel. Pendant toute la durée de l'opération, la température doit rester inférieure à 4°. Au-dessus du bêcher, on dispose un tube à brome contenant le mélange de 40 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique pur et de 40 cm<sup>3</sup> d'eau. On fait couler goutte à goutte le mélange acide dans le sérum, en agitant constamment ; le débit de l'acide doit être réglé

de façon que l'opération dure pendant trente minutes. Dès le début de l'opération, il apparaît un précipité jaune clair et, en même temps, une mousse abondante qui augmente le volume de dix fois environ. Après un repos de trente minutes, on centrifuge dans une centrifugeuse refroidie, le précipité étant soluble à chaud. On recueille le précipité dans un bécher refroidi, dans lequel on le lave en le mettant en suspension dans de l'eau distillée, refroidie et amenée à pH = 4. On centrifuge et on recommence ce lavage à deux nouvelles reprises (au total, 3 lavages).

Le précipité est mis en suspension dans 160 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, puis chauffé jusqu'à dissolution, laquelle devient totale après quinze minutes environ et quand la température approche de l'ébullition.

On refroidit ; on amène le pH à 9 par addition de soude et on porte à 110°, à l'autoclave pendant quinze minutes. Après refroidissement, on amène le pH à 7,4 et on dialyse pendant quatre jours à la glacière, en renouvelant l'eau des dialyseurs deux fois par jour.

Le tableau V rapporte les étapes successives de la mise au

TABLEAU V.

	Groupes acides <i>n<sub>A</sub></i>	Groupes basiques <i>n<sub>B</sub></i>	Antigénicité <i>α</i>
Sérum normal (Boeuf).....	1,27.10 <sup>-3</sup>	1,35.10 <sup>-3</sup>	2,62.10 <sup>-3</sup>
<u>T<sup>o</sup> de chauffage du diazo à pH=9</u>			
5 min. à 100°.....	0,78. "	0	0,78. "
5 " 105 .....	0,48. "	0	0,48. "
15 " 105 .....	0,47. "	0	0,47. "
15 " 110 .....	0,29. "	0	0,29. "
15 " 120 .....	0,46. "	0	0,46. "
<u>p<sub>H</sub> optimum pour un chauffage de 15 min. à 110°</u>			
p <sub>H</sub> = 3 .....	0,85. "	0,21.	1,06. "
9 .....	0,39. "	0	0,39. "
11 .....	0,56. "	0	0,56. "
7,5 .....	0,57. "	0	0,57. "
8 .....	0,47. "	0	0,47. "
8,5 .....	0,38. "	0	0,38. "
9 .....	0,32. "	0	0,32. "
<u>Durée du chauffage à 110° et à pH=9</u>			
10 min. .....	0,31. "	0	0,31. "
20 " .....	0,41. "	0	0,41. "
30 " .....	0,48. "	0	0,48. "

point du procédé. On constate, sur ce tableau, l'élimination totale et constante des groupes basiques, accompagnée d'une diminution importante des groupes acides.

## DISCUSSION.

Le tableau V montre que la diazotation entraîne l'élimination constante et totale des groupes basiques  $n_B$ , auxquels se sont substitués des — OH, alcooliques ou phénoliques selon le cas. Après la diazotation, la solution protéique contient donc des groupes — COOH et — OH. Comme le chauffage (2) entraîne l'élimination d'une grande partie de ces groupes acides  $n_A$  (75 à 80 p. 100), on peut se demander comment cette décarboxylation a pu être obtenue.

Deux réactions différentes semblent intervenir simultanément, d'une part une condensation réversible, et d'autre part une décarboxylation définitive.

a) *Réaction de condensation.* — On a vu précédemment que le simple chauffage du sérum provoque une condensation des différentes protéines, qui entraîne une diminution notable des groupes libres :



Une réaction analogue peut se produire lors du chauffage à l'autoclave du sérum nitrosé, mais la condensation s'opère alors sur des groupes — OH :



Cette réaction est réversible, faisant alors réapparaître des seuls groupes acides. Il est, dès ce moment, facile d'opérer un titrage et de mesurer la proportion dans laquelle la réaction de condensation est intervenue.

b) *Décarboxylation des protéines nitrosées.* — Comme on le sait, l'acide nitreux transforme les amines aliphatiques en alcools et les amines cycliques en phénols. Par exemple, les amino-acides conduisent aux acides-alcools, et la diazotation de lalanine entraîne la formation d'acide lactique.

L'expérience montre que la diazotation d'un amino-acide peut entraîner une modification plus profonde de la molécule. En effet, on peut distinguer deux phases successives dans l'action

(2) Dans les conditions où il est chauffé, le sérum ne subit pas d'hydrolyse mesurable, laquelle aurait entraîné une libération de — NH<sub>2</sub>; or, le tableau V montre au contraire la disparition totale des groupes basiques.

de l'acide nitreux. Il y a d'abord la formation d'un dérivé diazoïque, par exemple pour lalanine :



Dans certaines conditions expérimentales, l'encombrement moléculaire sur le carbone peut rendre le carboxyle instable, ce qui entraîne, au cours du chauffage, le départ simultané de l'azote et du CO<sub>2</sub> : il en résulte la formation d'alcool éthylique, lequel peut être dosé spécifiquement :



Voici l'expérience qui démontre l'intervention de cette double réaction. 5 g de L-alanine et 3,75 g de NO<sub>2</sub>K, dissous dans 50 cm<sup>3</sup> d'eau, reçoivent, à 2°, lentement et sous agitation, l'addition de 20 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique pur dilué au 1/2. On porte à l'ébullition jusqu'au départ des vapeurs nitreuses. On amène à pH = 10 et on chauffe à 110° pendant dix minutes. L'alcool éthylique est dosé avant et après le chauffage par la méthode de Nicloux modifiée [8].

Le tableau VI met en évidence la formation d'alcool éthylique,

TABLEAU VI.

	<u>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH mg %</u>
Avant diazotation.....	0
Après diazotation et chauffage.....	160

lequel ne peut résulter que d'une désamination et d'une décarboxylation simultanées conformément à l'hypothèse précédente.

Le faible rendement de l'opération (3 p. 100) peut être attribué à la perte d'alcool consécutive au chauffage à l'autoclave.

Le rapprochement de ce résultat d'une part et de la diminution du nombre des groupes acides du sérum, après diazotation et chauffage, d'autre part, conduit à supposer que la réaction précédente de désamination et de décarboxylation simultanées, qui vient de se produire avec la diazo-alanine, intervient encore pour les protéines diazotées, c'est-à-dire dans des conditions où le groupe diazoïque et le groupe carboxylique ne sont plus supportés par le même atome de carbone, mais sur des atomes différents et

répartis par la distance des quelques angströms requise pour la chaîne polypeptidique.

c) Proportion dans laquelle intervient chacune des réactions précédentes. — Un procédé très simple consiste à faire agir le cétène qui va déplacer le groupe oxhydryle — OH combiné pour l'acétyler, tandis que la fonction acide est libérée. En soumettant ainsi à l'action du cétène le sérum déjà diazoté et chauffé, on constate la réapparition d'un certain nombre de groupes acides (tableau VII) :

TABLEAU VII.

	Groupes acides $p_A$	Groupes basiques $p_B$	Antigénicité $\alpha$
Sérum (Boeuf).....	$1,27 \cdot 10^{-3}$	$1,35 \cdot 10^{-3}$	$2,62 \cdot 10^{-3}$
" diazoté et chauffé à $110^\circ$ ....	0,30. "	0	0,30. "
" " , puis soumis pendant 60 min. à un barbotage de cétène, le $p_H$ étant fixé à 9.....	0,81. -	0	0,81. -

Il résulte de ce tableau :

1° Que le chauffage après diazotation intéresse 88 p. 100 des groupes acides ;

2° Que, après traitement par le cétène, cette proportion tombe à 69 p. 100.

Autrement dit, les groupes acides ont été intéressés par le traitement selon les proportions suivantes :

Non-réactifs .....	12 p. 100
Éliminés par décarboxylation .....	69 p. 100
Condensés avec les —OH .....	19 p. 100

#### RÉSUMÉ.

Le traitement imposé au sérum a entraîné, pour son antigénicité, une diminution de 85 p. 100. Mais cette diminution reste insuffisante, et le protéïde complexe conserve, pour l'animal, un pouvoir antigénique manifeste (3).

Il est certain qu'au cours des traitements qui viennent d'être exposés, la spécificité *originelle* du sérum a notablement diminué, sinon disparu, comme l'ont déjà constaté Storck [9], Ardry et Elie [10]. Mais le *nouveau* complexe protéïdique possède encore

(3) Je remercie mes collègues, MM. Halpern et Eyquem, qui ont bien voulu se charger de cette expérimentation, à l'hôpital Broussais (Service du professeur Pasteur Vallery-Radot) et à l'Institut Pasteur (Laboratoire d'Hématologie).

un nombre suffisant de groupes dissociés pour posséder un pouvoir antigénique très marqué.

Comme l'élimination totale des groupes dissociés aboutirait à l'insolubilisation, l'emploi clinique des sérum s hétérologues ne semble pas devoir être envisagé.

## SUMMARY

### THE DESPECIFICATION OF BLOOD SERUM.

After being submitted to the treatment described, blood serum has lost 85 % of its antigenicity. In spite of this decrease, the complex protein still possesses a marked antigenicity.

The author demonstrates that after the treatment described, the original specificity of the serum is markedly decreased, if not destroyed, as observed by Storck [9], Ardry and Elie [10]. But the new antigenic protein complex still possesses enough dissociated groups to be endowed with a very marked antigenicity.

As a total elimination of the dissociated groups would lead to insolubilisation, the clinical use of heterologous sera does not seem to be possible.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] LOISELEUR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 152.
- [2] LECOMTE DU NOUY (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 244.
- [3] LOISELEUR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 439.
- [4] MASSONS (J.-M.). *Rev. Hématol.*, 1951, **6**, 448.
- [5] EDWARDS (F. R.). *Brit. med. J.*, 1944, **1**, 73.
- [6] MÉRIEUX (Ch.). *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130**, 506.
- [7] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et LUTZ (A.). *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130**, 495.
- [8] THIVOLLE (L.) et SONTAG (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **29**, 1369.
- [9] STORCK (J.). *Biol. méd.*, 1955, **44**, 73.
- [10] ARDRY (R.) et ELIE (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, **38**, 129.

**SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE VIRUS  
DU MYXOME INFECTIEUX**  
**PAR INOCULATION DE VIRUS DU FIBROME DE SHOPE**

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT (\*)

(avec la collaboration technique de E. LAVAL).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale)

En 1931, Shope constatait que des lapins cottontails (*sylvilagus*), qui avaient été antérieurement inoculés avec le virus de Sanarelli, se montraient résistants à l'inoculation du virus du fibrome infectieux [1]. En intervertissant l'ordre des inoculations, il établissait ensuite que, réciprocement, l'inoculation de virus du fibrome engendrait l'immunité vis-à-vis du virus du myxome.

Il est important de signaler que, très rapidement, de sérieuses réserves furent faites par certains expérimentateurs (Mc Kenney et Shillinger) sur la réalité de cette protection, tandis que des limites assez étroites lui étaient imparties par d'autres (Berry et Lighty). Tout récemment, en Angleterre, Rowe, Mansi et Hudson ont effectué sur ce sujet des expériences d'une certaine ampleur ; ils ont utilisé deux souches de virus du fibrome qu'ils injectaient ou dans le derme, ou sous la peau ; après épreuve avec une souche de myxome de haute virulence, mais non de très haute virulence, la proportion d'animaux ayant résisté sans troubles ou avec des symptômes plus ou moins caractérisés de myxome se situait entre 71 et 93 p. 100, la proportion de morts étant comprise entre 7 et 29 p. 100 [2].

Quoi qu'il en soit, les recherches dont ils ont été l'objet ont établi la parenté des deux virus ; ils sont semblables par la taille, la morphologie, la sensibilité aux agents physiques et chimiques [3] ; la sérologie révèle dans leur constitution une certaine communauté d'antigènes ; enfin, un facteur thermostable du virus de Sanarelli a permis à Berry de transformer le virus du fibrome en virus du myxome.

C'est sur ces notions que repose la vaccination des lapins d'Europe (*oryctolagus*) contre la myxomatose.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 novembre 1957.

Nous exposerons dans cette note l'étude expérimentale que nous avons consacrée à ce procédé d'immunisation en tenant compte, dans nos interprétations, des constatations auxquelles il a donné lieu dans la pratique courante depuis qu'il est appliqué en France.

Dans toutes les expériences nous avons employé des lapins domestiques de race commune, appartenant aux variétés élevées en France ; toutes les inoculations de virus du fibrome et de virus du myxome ont été faites par voie hypodermique (sauf cas particulier d'épreuve par moustiques).

#### VARIATIONS DE LA RÉSISTANCE ENGENDRÉE PAR LE VIRUS DE SHOPE.

Il n'est pas nécessaire d'expérimenter longuement sur ce sujet pour constater que l'action protectrice du virus du fibrome est très irrégulière chez les lapins d'Europe, domestiques ou sauvages, parfaitement réceptifs à la myxomatose. Cette irrégularité trouble sérieusement les essais et oblige assez fréquemment à les répéter.

Il y a des lapins qui, à la suite de cette immunisation, restent totalement indifférents à l'inoculation du virus de Sanarelli ; mais ils ne sont pas nombreux ; la plupart répondent par une réaction de forme et d'intensité variables : simple inflammation locale chez les plus résistants, myxomatose de type classique chez les moins résistants, avec tous les degrés intermédiaires ; chez le plus grand nombre des lapins qui présentent des signes caractérisés de myxomatose, la maladie, bénigne ou non, est du type nodulaire ou d'un type mixte.

Pour expliquer ces variations on a invoqué l'inégale virulence des diverses souches de virus du fibrome ; nous avons expérimenté avec trois d'entre elles tenues pour valables, sans réussir à obtenir des effets plus constants. Ce n'est pas spécialement d'une souche à l'autre que s'observent les discordances, mais, dans le cadre des essais effectués avec la même souche, d'un animal à l'autre, ou d'une expérience à l'autre. On pourrait donc avancer en première analyse que le degré d'immunité est fonction, d'une part, de l'aptitude individuelle du lapin à s'immuniser, d'autre part, et surtout, du pouvoir immunisant du virus au moment même de son emploi. Et nous disons surtout parce que, dans certains groupes de lapins vaccinés, tous les sujets se montrent également et fortement immunisés, le facteur individuel s'effaçant devant la faculté bien affirmée du virus. La propriété que possède le virus de Shope d'immuniser contre celui du myxome apparaîtrait ainsi comme liée à un support organique d'une grande fragilité.

Toutefois, une telle conception des faits ne tient pas compte

d'un facteur dont le rôle pourrait être invoqué : il s'agit de la résistance individuelle que les lapins sont susceptibles d'opposer au virus du myxome lui-même. Certains auteurs, et notamment Fenner, expliquent par elle les variations parfois considérables d'un sujet à l'autre dans le comportement vis-à-vis des souches atténuées du virus de Sanarelli. Pour eux, ces variations ne seraient que la manifestation des différences de réceptivité vis-à-vis de ces souches, différences qui s'estomperaient en présence de la souche hautement pathogène, apte à tuer tous les animaux dans de courts délais. La résistance opposée au virus de Sanarelli par les lapins inoculés préalablement avec le virus de Shope serait alors l'expression d'une immunité globale faite de la résistance naturelle de l'animal et de celle qu'il tiendrait du virus de Shope, l'une et l'autre d'intensité variable selon diverses circonstances.

#### DISSOCIATION DE L'APTITUDE NÉOFORMATRICE ET DU POUVOIR IMMUNIGÈNE.

Nous avons signalé cette particularité dans une note antérieure en l'illustrant d'exemples précis [4]. Nous y reviendrons sommairement pour en souligner l'intérêt.

Nous avons maintes fois observé au laboratoire qu'il n'existant pas de rapport constant entre l'importance du fibrome vaccinal et le degré ou la durée de l'immunité contre le myxome. Certains lapins porteurs de lésions vaccinales volumineuses, grosses comme des noix, des dattes, de petits œufs, restent très sensibles au virus de Sanarelli ; d'autres, chez lesquels l'inoculation du virus de Shope n'éveille aucune réaction fibromateuse ou donne lieu à la formation d'un fibrome de toute petite taille, se montrent ensuite fortement immunisés vis-à-vis de la myxomatose. Il est désirable que, dans la pratique, l'inoculation du virus de Shope soit suivie de l'édification d'un fibrome *in situ*, parce que cette lésion fait la preuve de la vitalité du virus employé ; mais de son existence et de son importance on ne peut rien déduire avec certitude quant à la valeur de l'immunité conférée.

Dans la pratique des vaccinations, la discordance entre les suites locales de l'inoculation du fibrome et les effets de la contamination ultérieure par le virus du myxome n'a pas échappé à l'attention des vétérinaires et des éleveurs ; bien souvent, à l'occasion de quelque échec de vaccination, ils nous ont signalé que, pourtant, une tumeur importante s'était formée au point d'inoculation du virus de Shope.

D'aucuns ont avancé que la durée de cette immunité était liée à la persistance de la lésion vaccinale ; il n'en est rien. Les fibromes les plus volumineux se résorbent dans les quelques

semaines, plus rarement dans les quelques mois qui suivent la vaccination ; or les lapins vaccinés, bénéficiaires de l'immunité, sont souvent aptes à résister au virus de Sanarelli pendant un an et même davantage. Cette constatation est corroborée par le fait que des lapins inoculés de fibrome par voie testiculaire et qu'on soumet peu de temps après à la castration peuvent demeurer réfractaires à la myxomatose. Une telle notion n'est pas pour surprendre ; l'agent du fibrome est un virus dont la présence dans l'organisme du lapin engendre habituellement la formation d'une tumeur fibromateuse, mais éveille d'autre part des réactions que la sérologie met en évidence, et dont on ne doit pas s'étonner qu'elles survivent à la disparition de la lésion.

#### DÉLAIS D'ÉTABLISSEMENT DE L'IMMUNITÉ.

Il est une autre particularité de l'action du virus de Shope qui a suscité quelque étonnement lorsqu'elle fut constatée (Hyde, 1939 [5]) et dont la cause réside dans l'étroite parenté des deux virus : la protection conférée par le fibrome contre le myxome s'établit très rapidement ; elle serait décelable, chez certains lapins, deux jours après l'inoculation du virus de Shope.

Nous nous sommes proposé de préciser cette notion ; il n'est pas sans intérêt pour la pratique des vaccinations d'être fixé sur les délais dans lesquels les animaux acquièrent une résistance suffisante pour surmonter, sans préjudice grave, les effets de la contamination par le virus de Sanarelli. Nous avons institué à cet effet quelques essais de vaccination dans lesquels les épreuves par inoculation de virus du myxome ont été effectuées respectivement trois, quatre, six, neuf et douze jours après l'inoculation de virus du fibrome. Les résultats de ces essais ont été réunis dans le tableau I. Chaque lapin y est désigné par son numéro ; la gravité de la réaction après l'épreuve est figurée par des croix avec échelle de 1 à 5 ; le signe 0 indique l'absence de réaction.

Les mutants naturellement atténus du virus du myxome se rencontrent assez fréquemment aujourd'hui et il est probable que le phénomène se développera dans les mois et années à venir ; aussi avons-nous estimé utile de rechercher les effets chez les lapins vaccinés d'un virus pleinement pathogène d'une part, et d'autre part d'un virus atténué (Loiret 55). On jugera de leurs virulences respectives par le comportement des témoins d'épreuve (première colonne) qui tous sont morts d'ailleurs.

De la lecture de ce tableau nous dégagerons les conclusions suivantes. En ce qui concerne l'épreuve par virus non atténué : trois jours après la vaccination les lapins se sont comportés comme les témoins non vaccinés ; à partir du quatrième jour, ils ont, dans l'ensemble, opposé une certaine résistance au virus de

TABLEAU I. — Délais d'établissement de l'immunité.

Sanarelli ; néanmoins, la proportion de ceux qui ont succombé était encore de 7 sur 15 ; il semble que douze jours après la vaccination l'immunité soit portée à son degré le plus élevé chez tous les animaux. En ce qui concerne l'épreuve par virus atténué : trois jours après la vaccination tous les lapins ont contracté une myxomatose plus ou moins caractérisée, mais déjà 5 sur 10 ont guéri ; à partir du quatrième jour, les réactions d'épreuve ont été faibles, très faibles ou nulles, et toutes ont été suivies de guérison. En résumé, c'est approximativement à partir du quatrième jour que l'immunité est nettement appréciable vis-à-vis du virus classique, et c'est à partir du quatrième jour qu'elle assure la protection contre le virus atténué. Nous rappellerons, pour souligner l'intérêt de ce dernier point, que, dans ces essais, tous les témoins d'épreuve avec virus atténué sont morts.

#### EFFETS COMPARÉS CHEZ LES VACCINÉS DE VIRUS D'AGRESSIVITÉS DIFFÉRENTES.

Dix lapins ont été inoculés avec une suspension de virus du fibrome ; deux mois après, on les éprouve par inoculation de virus du myxome ; 4 reçoivent, par voie hypodermique, 100 unités de virus pleinement virulent : ils mourront de myxomatose en treize, treize, quatorze et vingt et un jours ; les trois témoins meurent en dix, douze et quatorze jours ; 6 reçoivent 100 unités de virus atténué (Loiret 13) ; 4 contractent une myxomatose nodulaire suivie de guérison et 2 meurent de myxomatose en treize et vingt-sept jours ; les deux témoins meurent en dix-huit et vingt-huit jours. Il est évident que, dans cette expérience, l'immunité due au virus de Shope, qui était trop faible pour protéger les lapins contre un virus de haut pouvoir pathogène, permettait néanmoins à bon nombre d'entre eux de surmonter les effets d'un virus quelque peu atténué.

#### DURÉE DE L'IMMUNITÉ.

L'inconstance des effets du virus du fibrome vis-à-vis de celui du myxome est une cause d'erreur dans l'appréciation de la durée de la protection engendrée par le premier ; nous pensons que, comme nous l'avons exposé déjà, lorsque l'immunité se révèle défaillante dans les mois qui suivent la vaccination, elle n'a jamais été de très haute qualité. Il n'est pas douteux qu'avec le temps l'immunité s'affaiblit, mais cet affaiblissement est assez lent. Nous avons réuni dans le tableau II les résultats de 4 essais de vaccination avec épreuves échelonnées. Les épreuves dans le mois qui suivait la vaccination ont été toutes pratiquées avec le virus classique, à l'exception d'une (troisième essai) ; les épreuves

TABLEAU II. — Durée de l'immunité.

TÉMOINS D'ÉPREUVE		ÉPREUVE APRÈS					
Virus classique	Virus atténué	10 à 30 jours		6 à 7 mois			
P 70 +++++ Mort en 11 J. P 95 +++++ Mort en 11 J.	M 18 +++++ Mort en 21 J. M 20 +++++ Mort en 20 J.	H 39 ++ Guérison H 40 ++ Guérison H 41 ++ Guérison	H 31 ++ Guérison H 32 + Guérison H 34 ++ Mort en 24 J. H 35 ++ Guérison	12 à 14 mois			
988 +++++ Mort en 10 J. 982 +++++ Mort en 11 J.	X 93 +++++ Mort en 19 J. X 94 +++++ Mort en 28 J.	975 ++ Guérison 977 +++, Mort en 13 J. 978 +++, Mort en 24 J. 979 ++ Guérison 980 ++ Guérison	960 ++ Guérison 971 +++, Mort en 15 J. 972 0 Guérison 973 +++, Mort en 19 J. 974 +++, Guérison				
J 4 +++++ Mort en 25 J. P 99 +++++ Mort en 17 J.	H 79 + Guérison H 80 0 Guérison H 81 ++ Guérison	H 91 ++ Guérison H 92 +++, Mort en 26 J. H 93 +++, Mort en 19 J.	Guérison				
S 5 +++++ Mort en 16 J. S 4 +++, Mort en 16 J.	H 16 + Guérison	H 94 +++, Mort en 27 J.	Guérison				
670 +++++ Mort en 12 J. 571 +++++ Mort en 10 J. 230 +++++ Mort en 11 J.	K 93 +++++ Mort en 19 J. K 94 +++++ Mort en 28 J.	565 ++ Guérison 560 +++, Guérison 511 +++, Guérison 507 +++, Guérison 505 +++, Mort en 17 J.	561 ++ Guérison 562 ++ Guérison 508 +++, Guérison 509 +++, Mort en 15 J.				

après six mois et après douze mois l'ont été avec virus atténué ; ces dernières étaient donc un peu moins sévères que les premières ; néanmoins, tous les témoins y sont morts. La lecture du tableau montre que 3 lapins sur 16 vaccinés ont succombé à l'épreuve faite dans le mois suivant, 3 sur 9 à l'épreuve faite après six mois et 4 sur 8 à l'épreuve faite après douze mois. Ces chiffres n'ont qu'une valeur indicative puisqu'ils portent sur de petits groupes de vaccinés, mais l'impression qui s'en dégage tire un certain intérêt du fait que, dans chaque essai, les épreuves successives concernaient des animaux vaccinés en même temps et de la même façon.

EFFETS COMPARÉS CHEZ LES LAPINS VACCINÉS  
DE L'INOCULATION SOUS-CUTANÉE ET DES PIQUURES DE MOUSTIQUES.

Des lapins qui avaient reçu préalablement du virus de Shope ont été éprouvés, les uns après trois semaines, les autres après six mois, avec un virus atténué (Sologne 55). Mais dans chaque groupe l'épreuve a consisté, pour quelques animaux et leurs témoins non immunisés, en une inoculation sous la peau, pour quelques autres et leurs témoins, en 4 ou 5 piqûres de moustiques infectés (*Anopheles maculipennis atroparvus*). On n'a pas relevé de différences accusées selon le mode d'infection. Tous les témoins sont morts dans des délais compris entre dix-huit et trente et un jours ; parmi les vaccinés éprouvés par inoculation, 4 sur 6 ont résisté et 2 sont morts en vingt-quatre et vingt-cinq jours ; parmi les éprouvés par piqûres de moustiques, 4 sur 7 ont résisté et 3 sont morts en dix-neuf, vingt-cinq et vingt-six jours. Ce qui se dégage de cet essai limité mais précis, c'est que quelques piqûres de moustiques peuvent être aussi sûrement infectantes et susceptibles de surmonter l'immunité que l'injection hypodermique de quelques centaines d'unités virulentes ; il est permis de penser que les résultats expérimentaux enregistrés au laboratoire reflètent assez fidèlement ce qui se réalise dans la nature, ou du moins ne pêchent pas par excès de rigueur.

PERSISTANCE DE L'IMMUNITÉ CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS,  
PUIS ÉPROUVÉS UNE PREMIÈRE FOIS.

L'objet des recherches rapportées ici était d'apprecier le degré de résistance au virus de Sanarelli de lapins préalablement vaccinés par inoculation de virus de Shope, puis éprouvés une première fois dans des délais variés par inoculation de virus du myxome. Nous avons réuni dans le tableau III les plus significatifs de ces essais. Après la vaccination, les lapins ont été éprouvés dans des délais allant de deux semaines

à douze mois, avec des réactions modérées, faibles ou nulles (colonnes 2 et 3); puis dans des délais allant de deux à vingt-six mois, ils ont été inoculés à nouveau avec du virus de Sanarelli (colonnes 4 et 5). La première épreuve a été faite ou avec le virus classique (A) ou avec un virus atténué (B) [Loiret 55, Loir-et-Cher B, Loiret 13]. La deuxième épreuve a été faite avec le virus classique exclusivement. Les réactions des témoins d'épreuves sont portées dans les colonnes 6 et 7; tous ces témoins sont morts dans des délais allant de dix à quatorze jours pour le virus classique et de seize à vingt-quatre jours pour les virus atténués.

L'examen comparatif des colonnes 3 et 5 conduit aux constatations suivantes. Dans leur ensemble, les lapins vaccinés, qui ont été éprouvés une première fois avec le virus classique, résistent sans troubles graves à une deuxième épreuve avec le même virus, même après plus de deux ans; mais il se trouve parmi eux des animaux qui, n'ayant réagi daucune façon à la première épreuve, succombent à la seconde pratiquée deux mois après seulement. Si l'on tient compte de ce que presque tous les autres ont manifesté quelque trouble à la suite de la première épreuve, on est amené à conclure que chez eux l'immunité active due au virus de première épreuve s'est substituée à la résistance engendrée par le virus-vaccin de Shope. Le cas des 4 derniers lapins de la liste mérite d'ailleurs d'être précisé; ils avaient tous fait au point d'inoculation du virus de Shope un fibrome de la grosseur d'une figue; et cependant, deux à deux, ils se sont comportés très différemment dans la suite, lors de la première épreuve et plus encore lors de la seconde, puisque deux en sont morts alors que les deux autres restaient indifférents.

Quant aux lapins éprouvés la première fois avec virus atténué, épreuve qui n'a suscité chez eux qu'une très discrète réaction au point d'inoculation, ils se sont révélés, pour la plupart, dépourvus d'immunité lors de l'épreuve seconde, pratiquée du cinquième au seizième mois; cependant, ceux qui ont subi cette deuxième épreuve deux mois seulement après la première, ont parfaitement résisté; ils étaient encore, apparemment, sous le bénéfice de l'immunité engendrée par la première épreuve, immunité sans doute insuffisante pour assurer une protection de longue durée.

#### RÉSUMÉ.

Le comportement, vis-à-vis du virus du myxome, du lapin préalablement inoculé avec le virus du fibrome est sous la dépendance de facteurs multiples se rapportant les uns à son individualité propre, les autres aux propriétés de chacun des virus considérés.

TABL. III. — Persistance de l'immunité chez les lapins vaccinés qui ont été ensuite éprouvés par inoculation de virus.

Lapin	Délais depuis la vaccination	Intensité de la réaction	1ère EPREUVE		2ème EPREUVE		TÉMOINS		
			Délais depuis la 1ère épreuve	Intensité de la réaction	Délais depuis la 1ère épreuve	Intensité de la réaction	1ère épreuve	2ème épreuve	
36.17	3 mois 1/2	+++	26 mois	++	Mort en 12 j. mauvais état Général	266 ++++ Mort en 13 j.	424 ++++ Mort en 11 j.		
A	{ 357 325 329 863 820 811 913 36.11. 44 285 286 C 288 D 210	{ 3 semaines 12 mois 12 mois 1/2 2 semaines 2 semaines 1 mois 8 1 mois 1/2 5 semaines 4 jours 3 semaines - id - - id - - id - - id -	{ 25 mois 23 mois 23 mois 23 mois 17 mois 1/2 17 mois 1/2 16 mois 16 mois 10 mois 1/2 10 mois 2 mois 0 0 0 0	{ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++	{ Guérison Guérison Guérison Guérison Guérison Guérison Guérison Mort en 34 j. Guérison Guérison - id - - id - - id -	{ 332 ++++ Mort en 14 j. 459 ++++ Mort en 13 j. - id - 134 ++++ Mort en 13 j. 864 ++++ Mort en 12 j. 831 ++++ Mort en 13 j. - id - 43 ++++ Mort en 10 j. 92 ++++ Mort en 12 j. 217 ++++ Mort en 11 j. - id - - id - 218 ++++ Mort en 13 j.	{ - id - - id -	{ 424 ++++ Mort en 11 j.	
B	{ J 95 J 94 J 36 H 31 H 29 R 96 R 97 R 98 R 99 R 256 258 259 264	{ 3 mois 1/2 3 mois 1/2 9 jours 5 mois 1/2 5 mois 1/2 9 jours - id - - id - - id - 1 mois 8 - id - - id - - id -	{ 24 mois 24 mois 16 mois 12 mois 1/2 5 mois 1/2 - id - - id - - id - 0 0 0 - id - - id - - id -	{ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++	{ Guérison Guérison Mort en 14 j. Guérison Guérison Guérison Guérison Mort en 10 j. Mort en 11 j. Mort en 8 j. Mort en 11 j.	{ 406 ++++ Mort en 14 j. - id - 54 ++++ Mort en 21 j. 20 ++++ Mort en 20 j. S 5 ++++ Mort en 16 j. - id - - id - - id - - id - - id - - id - - id -	{ - id - - id -	{ 424 ++++ Mort en 11 j. - id - 274 ++++ Mort en 10 j. - id - - id - - id - - id - - id -	

A. — 1<sup>re</sup> et 2<sup>de</sup> épreuves avec virus classique.

B. — 1<sup>re</sup> épreuve avec virus atténué, 2<sup>de</sup> épreuve avec virus classique.

1. — Subit une 3<sup>e</sup> épreuve six mois après la seconde : + + Mort en onze jours. (Mauvais état général).
2. — Subit une 3<sup>e</sup> épreuve dix-huit mois après la seconde : + Guérison.

Tous les lapins ne tirent pas le même bénéfice de l'inoculation qui leur est faite du virus de Shope et tous ne sont pas, au départ, également sensibles au virus de Sanarelli. La résistance qu'ils opposent au second lorsqu'on les a préalablement inoculés avec le premier, apparaît comme la somme de ce qu'ils pouvaient posséder d'immunité naturelle contre le virus du myxome et de l'immunité plus ou moins forte que le virus de Shope a engendrée en eux.

La propriété qu'a le virus de Shope de préserver le lapin contre les effets du virus du myxome est d'une inconstance remarquable ; il est logique de penser que son substrat organique est d'une grande fragilité vis-à-vis des actions auxquelles il se trouve exposé après inoculation au lapin. On observe fréquemment la dissociation du pouvoir néoformateur du virus du fibrome et de son aptitude à vacciner contre le virus du myxome ; nous obtenons plus souvent la formation d'un volumineux fibrome que l'élaboration d'une solide immunité contre le myxome.

Toutes choses égales, les souches atténées du virus du myxome éveillent des réactions moins vives que les souches hautement pathogènes chez le lapin immunisé par le virus du fibrome ; si l'on admet l'existence de virus myxomateux impurs, formés de souches inégalement virulentes, on doit s'attendre à enregistrer des variations importantes dans le comportement des lapins vaccinés lorsqu'ils sont contaminés par de tels virus.

L'immunité engendrée par le virus du fibrome s'établit très rapidement ; dans les conditions où nous avons expérimenté, elle est nettement appréciable vis-à-vis du virus classique à partir du quatrième jour ; elle est déjà assez forte à ce moment pour assurer la protection contre un virus atténue.

C'est une immunité durable, dont les effets restent caractérisés pendant une année environ ; lorsqu'elle se révèle totalement défaillante dans les mois qui suivent la vaccination, on est en droit de douter qu'elle se soit jamais solidement établie.

Le comportement vis-à-vis du virus du myxome des lapins vaccinés d'abord, puis éprouvés une première fois, est variable et difficilement prévisible. D'une manière générale, une première épreuve avec souche très virulente engendre une immunité absolue ou presque, et de très longue durée, lorsqu'elle provoque une réaction ; il n'en va pas forcément de même chez les lapins qui restent indifférents à une telle épreuve. La résistance des sujets éprouvés une première fois déjà avec un virus atténue est, semble-t-il, assez courte durée, mais vraisemblablement en rapport aussi avec l'intensité de la réaction.

Nous avons employé dans toutes nos expériences, des lapins domestiques de race commune, appartenant aux variétés élevées en France. Toutes les inoculations de virus ont été faites par voie

sous-cutanée ; les observations que nous avons pu recueillir par ailleurs, à la suite d'inoculations par d'autres voies, intradermique et intramusculaire notamment, ne modifient pas le sens général des présentes conclusions.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] SHOPE (R. E.). *J. exp. Med.*, 1932, **56**, 803.
- [2] ROWE (R.), MANSI (W.) et HUDSON (J. R.). *J. comp. Path.*, 1956, **66**, 290.
- [3] F. FENNER. *Nature*, 1953, **171**, 562.
- [4] H. JACOTOT, A. VALLÉE, B. VIRAT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 381.
- [5] R. R. HYDE. *Am. J. Hyg.*, 1939, **30**, 47.

#### SUMMARY

##### STUDIES ON IMMUNIZATION AGAINST MYXOMA VIRUS BY MEANS OF INOCULATION OF SHOPE FIBROMA VIRUS.

The comportment towards myxoma virus of rabbits previously inoculated with fibroma virus depends on individual factors on the one hand, on the properties of each virus on the other. The resistance to Sanarelli's virus of rabbits previously inoculated with Shope virus is represented by their naturel immunity against myxoma virus plus the more or less important immunity induced by the fibroma virus.

The dissociation of the neoformation property from the immunizing character of Shope's virus is often observed. The first one is less inconstant than the second one.

The immunity induced by fibroma virus against the standard myxoma virus already exists on the fourth day ; at this moment it is strong enough to protect against an attenuated virus. It is a durable immunity, lasting about one year.

When the rabbits which have been vaccinated by fibroma virus and challenged by myxoma virus are submitted to a second inoculation of myxoma virus, the degree and duration of their resistance depend on the virus used for the first challenge and on the fact that this virus has induced a reaction or not.

All the experiments have been carried out on domestic rabbits, belonging to the common race and to the strains bred in France.

## **SUR LE DÉVELOPPEMENT DU VIRUS VACCINAL**

par Odile CROISSANT (\*), Pierre LÉPINE (\*)  
et Ralph W. G. WYCKOFF (\*\*) (\*\*\*)

L'étude au microscope électronique de la façon dont les virus du groupe variolo-vaccinal se développent au sein des cellules infectées est rendue particulièrement attachante par la facilité avec laquelle les particules élémentaires infectieuses de ces virus peuvent être identifiées.

Il y a huit ans que nous avons commencé à examiner au microscope électronique des tissus infectés par la vaccine [1], et nous avons poursuivi nos observations au fur et à mesure de l'amélioration des techniques vers une meilleure fixation et l'obtention de coupes plus fines. L'un des points les plus surprenants de ces études et des recherches similaires [2] est qu'en dépit de la netteté avec laquelle on peut voir le virus, on n'a pu jusqu'ici saisir la suite des étapes préliminaires qui aboutissent à sa formation. Ce fait est dû en grande partie à ce que les particules élémentaires du virus ne deviennent identifiables que vers la fin du processus infectieux, alors que les cellules dans lesquelles elles prennent naissance commencent à mourir.

Une identification plus précoce, qui serait nécessaire pour les suivre dans leur développement, est rendue incertaine par les difficultés qui surgissent lorsqu'il s'agit de les différencier des structures non virales que l'on peut trouver à la fois dans les cellules infectées et dans les cellules normales. Ces structures, qui paraissent être de petites mitochondries, deviennent particulièrement nombreuses dans les cellules infectées par la vaccine. Les relations que l'on peut observer entre ces structures et le virus donnent à penser que celles-ci sont étroitement associées au mécanisme de la production virale, et rendent nécessaire un examen serré de cette hypothèse. Les recherches préliminaires rapportées dans le présent travail exposent les arguments recueillis en faveur d'une telle relation.

(\*) Service des Virus, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV<sup>e</sup>), France.

(\*\*) Laboratory of Physical Biology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

(\*\*\*) Manuscrit reçu le 16 septembre 1957.

## MÉTHODE.

Nos observations ont été faites sur la membrane chorio-allantoïque d'embryon de poulet infecté alors que l'œuf avait dix jours d'incubation, le prélèvement ayant lieu trois à cinq jours après l'inoculation. Le virus était constitué par une lymphé vaccinale de veau, souche Lederle, utilisée après plusieurs passages sur embryon de poulet. Les membranes, récoltées sur les embryons vivants, étaient immédiatement fixées pendant une à deux heures dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100 dans une solution tampon de véronal à pH 7,6. Après fixation, les membranes ont été lavées ; les zones où apparaissaient les pustules vaccinales bien développées étaient excisées aux ciseaux et découpées en fragments d'environ 0,5 mm de côté. Ces derniers étaient alors déshydratés par passage dans une série d'alcools et inclus dans le méthacrylate de butyle selon la technique courante. En vue de l'examen au microscope électronique, des séries de coupes fines ont été exécutées, sur les tissus inclus, au moyen d'un microtome Spencer modifié pour l'obtention de coupes ultra-fines et équipé de rasoirs en verre. Après déplissage et étirement des coupes sur un bain d'eau tiède, ces dernières étaient montées pour l'examen sur des grilles en cuivre recouvertes de carbone. Dans la plupart des cas, la matière plastique d'inclusion n'était pas enlevée avant l'introduction du spécimen dans le microscope ; parfois cependant, le plastique a été préalablement dissous par traitement ménagé à l'acétate d'amyle. En pareil cas, les coupes, dont on avait retiré la matière d'inclusion, étaient légèrement ombrées au palladium avant d'être soumises à l'examen au microscope électronique.

## RÉSULTATS.

On peut voir sur nos images le mode général d'association intime qui s'établit entre les particules de virus et les petites structures mitochondriales communément observées dans les cellules où le virus commence à se développer. Les amas de particules présentant une opacité intense, dans la partie inférieure droite de la planche I, par exemple, sont formés de virus ; on peut les identifier comme tels par comparaison avec les très nombreuses particules typiques du virus qui sont présentes dans les cellules où l'infection est à un stade plus avancé. Il y en a plusieurs dans la préparation ombrée de la planche II (partie inférieure). Il y a lieu de noter que sous l'aspect où on les observe dans les tissus, ces corps élémentaires typiques ont d'habitude une forme ellipsoïdale ; ce n'est que très rarement qu'on les observe avec

l'aspect rectangulaire, en forme de brique, qui leur est habituel sur les préparations de virus purifié, séchées à l'air libre. Quelques-unes des petites structures mitochondriales avec lesquelles le virus est associé, de même que de plus grandes mitochondries, peuvent être observées sur la planche II ; elles sont plus nombreuses sur les planches III, IV et V. Sous leur forme typique, elles ont une section grossièrement circulaire et un diamètre à peu près égal au grand axe de la particule ellipsoïdale de virus, mais quelques-unes se présentent sous l'aspect de bâtonnets (pl. IV). Elles ont une longue membrane limitante, bien définie et une structure interne plus dense que celle du cytoplasme qui les entoure. Leur texture présente un grain très fin, mais sur certaines d'entre elles on peut clairement discerner une structure membranuse comme celle des *cristae* des plus grandes mitochondries (pl. I et III).

Comme on le voit sur nos clichés, beaucoup de petites mitochondries présentent une structure interne différente lorsque les particules de virus commencent à apparaître. Elles deviennent plus généralement denses et souvent (comme on le voit sur les pl. IV et V) elles renferment des régions localisées d'une extrême opacité. Sur nombre de ces particules, l'aspect qui en résulte fait que l'on ne peut être certain si l'on est en présence de mitochondries altérées ou de particules virales.

Cet aspect, et le fait que plus de mille microographies électro-niques de coupes de tissus infectées par la vaccine ne nous ont pas offert d'autre indice satisfaisant d'un mode de formation du virus, rendent nécessaire d'examiner sérieusement l'hypothèse selon laquelle les particules de virus dérivent des petites mitochondries par condensation de leur contenu. Il est aisé de choisir parmi les particules qui apparaissent sur nos clichés une série de formes qui pourrait être interprétée comme représentant la succession des stades de la transformation des mitochondries en virus.

Nous poursuivons nos expériences, à la fois avec le virus vaccinal et avec ceux des autres affections du groupe des varioles, en vue d'accumuler des arguments supplémentaires qui, ou bien confirmeront ou bien écarteront définitivement ce mécanisme possible de formation du virus.

#### PLANCHE I

Coupe de tissu infecté avec le virus vaccinal. Détails de structure interne visibles dans de nombreuses particules de virus reconnaissables à leur opacité. Remarquer aussi la structure membranuse interne des petites mitochondries à la partie supérieure droite du cliché.  $\times 30\,000$ .

*Annales de l'Institut Pasteur.*

T. 94.

Mémoire Odile CROISSANT, Pierre LÉPINE  
et Ralph W. G. WYCKOFF.

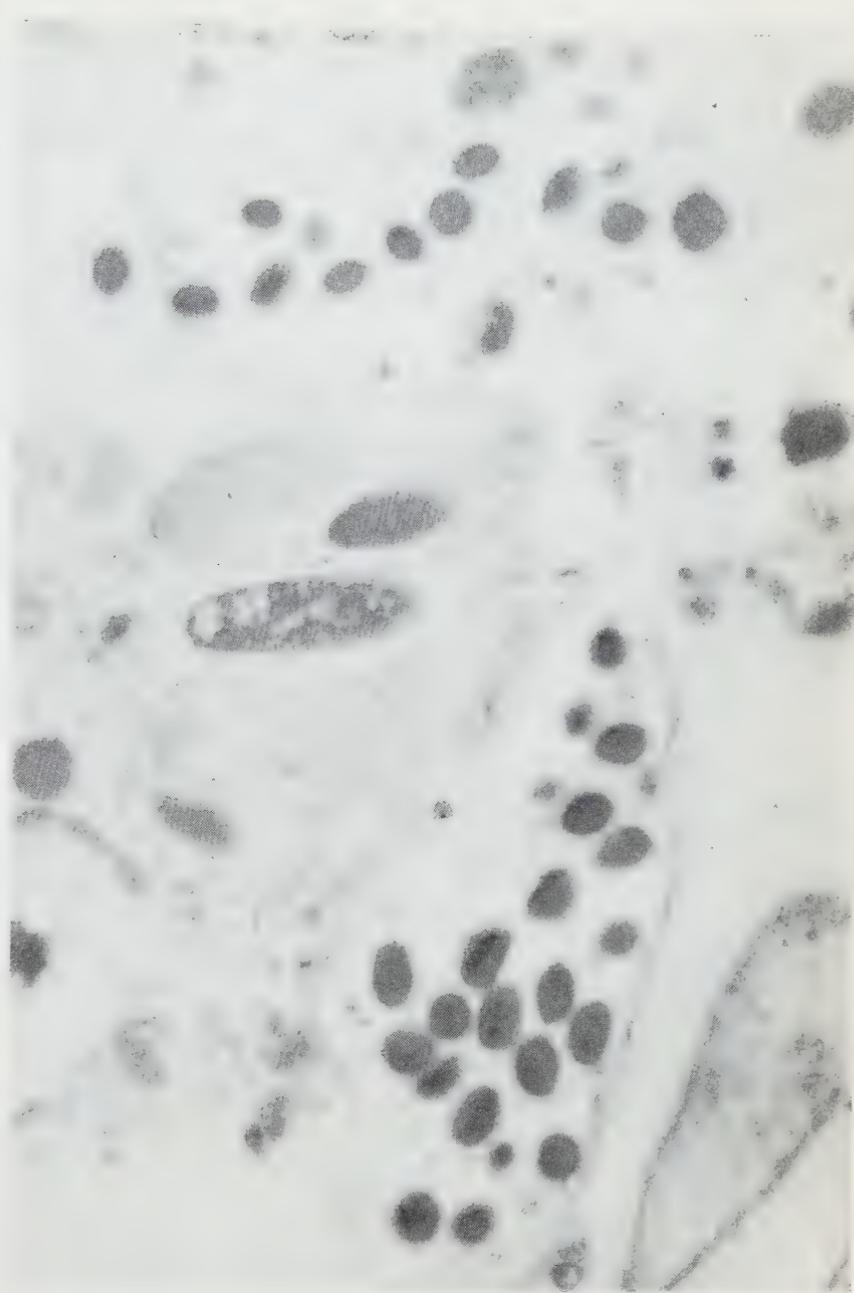


PLANCHE I.

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS

PLANCHE II.

Zone d'un tissu infecté semblable à celle de la planche I, observée après dissolution du milieu plastique d'inclusion et ombrage. Les particules ellipsoïdales foncées que l'on voit à la partie inférieure sont des particules de virus. Noter également la présence de plusieurs petites mitochondries moins opaques et d'un certain nombre de formations présentant des aspects intermédiaires entre les deux précédentes structures.  $\times 20\,000$ .



PLANCHE II.

PLANCHE III

Champ montrant l'aspect de particules qui pourraient être des aspects de transition entre les mitochondries et le virus. Les particules foncées ayant l'aspect de virus, en haut et à gauche, et les mitochondries plus claires que l'on observe à la partie inférieure droite contiennent l'une et l'autre de fines membranes internes.  $\times 35\,000$ .

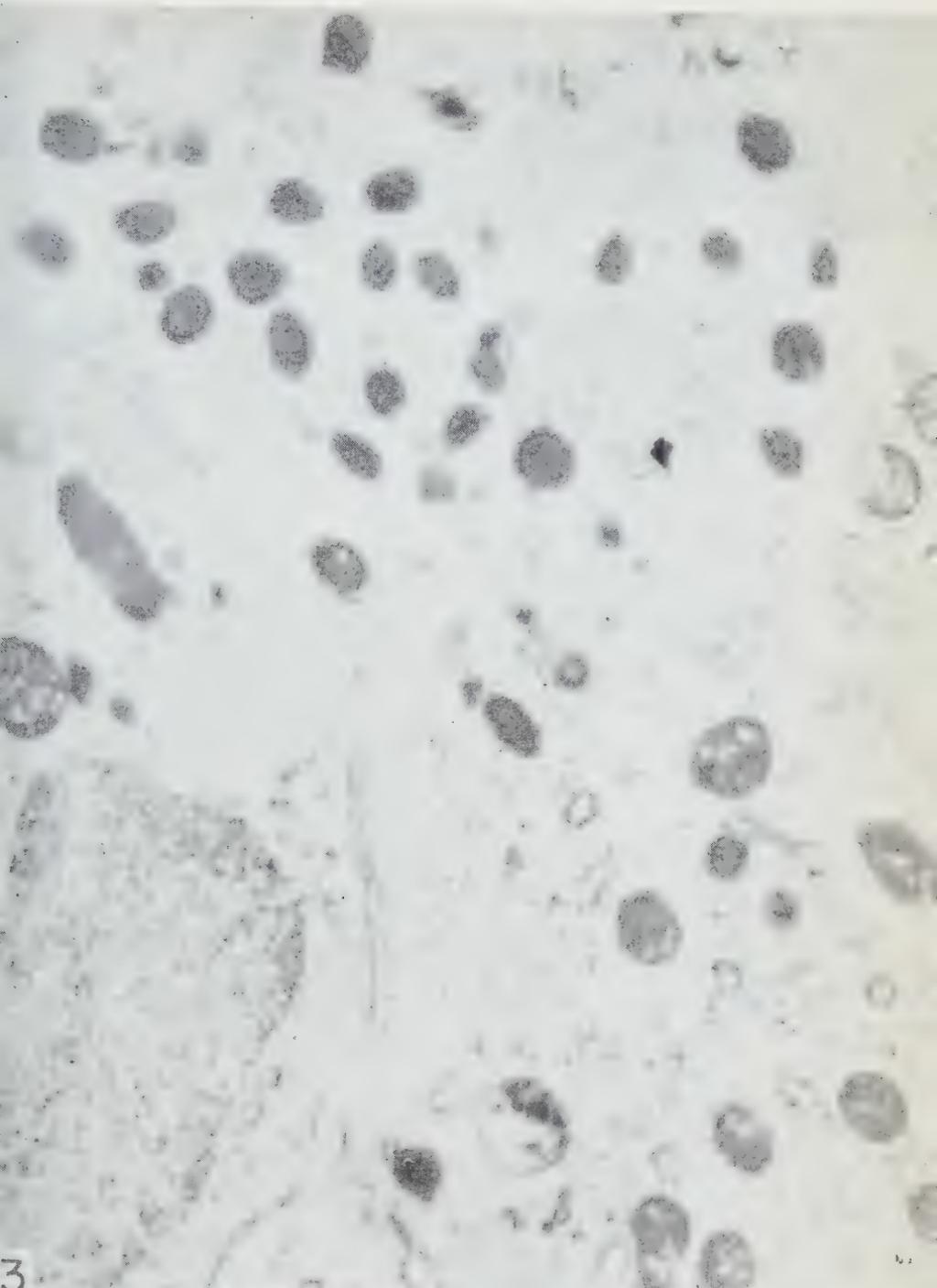


PLANCHE III.

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS



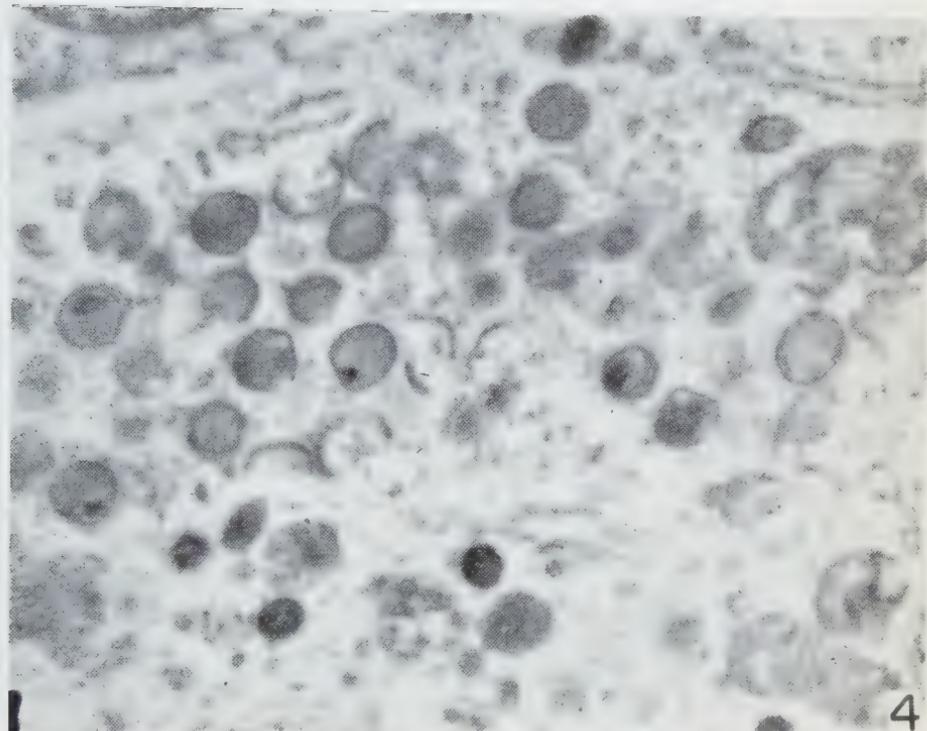


PLANCHE IV

Champ montrant les régions opaques développées à l'intérieur de plusieurs des fines structures mitochondrielles. Noter la mitochondrie allongée en bâtonnet, visible à l'extrême droite de la partie inférieure.  $\times 33\,000$ .



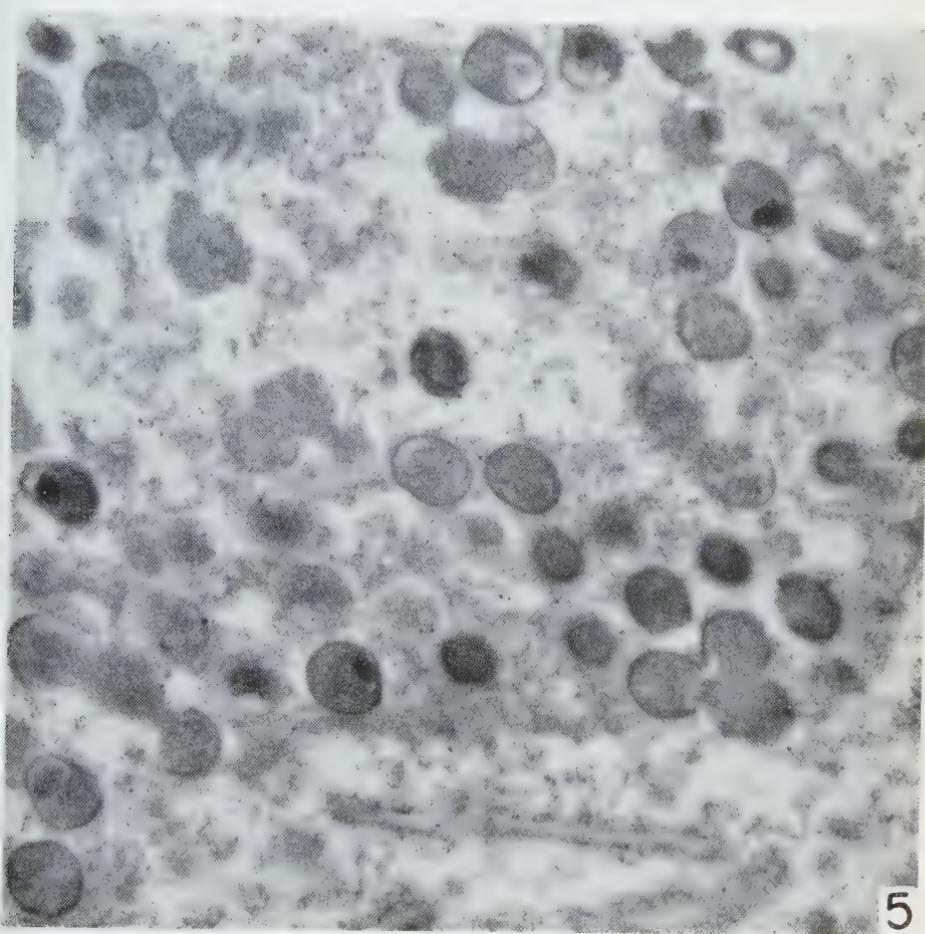


PLANCHE V

Autre champ montrant des formes analogues à celles visibles sur la pl. IV.  $\times 26\,000$ .



## SUMMARY

## STUDIES ON THE COMPORTMENT OF VACCINIA VIRUS.

Electron micrographs have been made of thin sections through chicken embryo membranes showing early stages of the development of vaccinia virus. These reveal many minute cytoplasmic bodies having the internal structure typical of mitochondria. As the mature virus particles develop so many forms transitional in appearance between them and these mitochondria-like objects are present that serious attention must be given them as possible precursors of the virus.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] WYCKOFF (R. W. G.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 565 ; *Z. Zellforsch.*, 1953, **38**, 409. — LÉPINE (P.) et CROISSANT (O.). *Presse méd.*, 1952, **60**, 1427.
  - [2] GAYLORD (W. H., Jr.) et MELNICK (J. L.). *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 157. — MORGAN (C.), ELLISON (S. A.), ROSE (H. M.) et MOORE (D. H.). *Exp. Cell Res.*, 1955, **9**, 572.
-

**ÉVOLUTION HISTOLOGIQUE  
DE LA  
KÉRATO-CONJONCTIVITE A BACILLES DYSENTÉRIQUES  
DU COBAYE**

par Michel PIÉCHAUD, Szymona SZTURM-RUBINSTEN  
et Danielle PIÉCHAUD (\*).

*(Institut Pasteur, Service de Microbie générale,  
et C. N. R. S.)*

Les différentes espèces de *Shigella* provoquent chez le lapin et le cobaye une kérato-conjonctivite, dont nous avons déjà rapporté l'aspect clinique et bactériologique [1]. L'étude histologique en est faite, ici, chez le cobaye ; culture et mode d'inoculation étant toujours les mêmes, nous indiquons seulement les points de technique liés à cette étude : nous avons tué les cobayes au chloroforme, sauf deux d'entre eux, qui sont morts spontanément. On attend une à deux heures pour énucléer l'œil (délai nécessaire pour éviter une hémorragie), et, pour empêcher la dessiccation de la cornée, on recouvre les régions orbitaires de papier filtre humecté d'eau. L'œil est prélevé avec le plus de conjonctive possible, parfois avec les paupières, sans léser la cornée. Au début, ayant déjà étudié un œil normal de cobaye, nous prenions l'œil inoculé seul ; ensuite nous avons systématiquement prélevé les deux yeux, dont la comparaison nous a surtout été utile dans les premiers stades de l'infection. Les yeux, après injection de fixateur à la seringue, dans la chambre postérieure, séjournent vingt-quatre heures dans du liquide de Bouin, puis sont coupés en deux selon leur axe optique, à l'aide d'une lame de rasoir. Le cristallin durci peut être difficile à couper, mais le reste des opérations est mené à bien avec le maximum de rapidité et le moins de déformations possible par cette technique. Après un nouveau séjour dans le Bouin, de quelques heures, on déshydrate (alcool absolu, trois bains en six à huit heures ; toluène, trois bains en six à huit heures) et on imprègne (douze heures dans la

(\*) Manuscrit reçu le 24 octobre 1957.

paraffine). Les blocs sont orientés de façon à couper la cornée en long et les coupes de 5  $\mu$  d'épaisseur doivent être étalées avec grand soin.

Colorations : hématine-éosine ; thionine phéniquée et Mann-Dominici à l'érythrosine-bleu de toluidine ou érythrosine-bleu Borrel pour la recherche des bactéries ; coloration de Gram (brasiliéne-gram-picro-indigo-carmin) qui décale les bactéries Gram-positives et permet une bonne étude du conjonctif grâce au picro-indigo-carmin de Cajal.

*Caractères histologiques particuliers à l'œil normal de cobaye :* à signaler simplement l'importance des formations lymphoïdes parfois très organisées au voisinage des culs-de-sac conjonctivaux ; l'abondance habituelle du pigment dans l'épithélium de la conjonctive bulbaire (pigment dont naturellement l'épithélium cornéen est dépourvu) ; le manque de netteté fréquent de la membrane basale antérieure de Bowman ; la minceur relative de la basale postérieure de Descemet sur laquelle repose un endothélium postérieur dont les noyaux sont en mince croissant (pl. I, fig. 1).

Nous rapporterons d'abord une série homogène d'observations, faites avec une souche de *Shigella boydii* 2 (Saigon 56-352) : la première faite trois heures après l'inoculation, la dernière au bout de trente-cinq jours.

1<sup>o</sup> Coupe n° 9 : trois heures après l'inoculation et :

2<sup>o</sup> Coupe n° 10 : six heures après l'inoculation, pas de différence avec l'œil sain.

3<sup>o</sup> Coupe n° 11 : neuf heures après l'inoculation, début d'ulcération en plusieurs endroits.

4<sup>o</sup> Coupe n° 12 : dix-huit heures après l'inoculation, début d'ulcération en plusieurs points de la cornée, sous forme de désunion des cellules épithéliales, aplatissement, condensation, desquamation. Pas de leucocytes au niveau du limbe. Réaction leucocytaire peu distincte au niveau de la conjonctive. Pas de germes visibles.

5<sup>o</sup> Coupe n° 13 : vingt-quatre heures après l'inoculation, plusieurs ulcères en formation, de tailles variées. Au niveau des ulcérations, les cellules épithéliales se gonflent, leur cytoplasme devient moins colorable, se vacuolise, le noyau se rétracte, se chiffonne, laissant une auréole claire ; les cellules se désunissent. L'afflux leucocytaire commence au niveau du limbe, en s'avancant en pointe sous l'épithélium ; tout près, quelques leucocytes s'assemblent, sous un début d'ulcère. Inflammation conjonctivale, infiltration légère du chorion, quelques petites masses fibrino-leucocytaires en surface ; cette réaction est particulièrement accentuée au voisinage du limbe. Chambre antérieure : pas de modification. Des bactéries sont visibles en deux endroits au niveau d'ulcères en formation (épithélium tendant à se désunir ou desquamant), la plupart au milieu de cellules épithéliales aplatis,

ou plus probablement dans leur cytoplasme, quelques-unes plus profondément et sans aucun doute dans le cytoplasme des cellules basales. Pas de bactéries dans l'exsudat ou en surface de la conjonctive.

6<sup>o</sup> Coupe n° 14 : trente-six heures après l'inoculation, ulcération presque totale ; il ne reste plus que des îlots d'épithélium, réduits au centre à la couche basale et à une ou deux assises de cellules dont les espaces intercellulaires sont vacuolisés, sur les bords, à la couche basale dont les cellules sont nécrosées et dissociées. L'infiltration leucocytaire de la cornée, très épaisse et œdématisée, est totale, surtout dense au niveau du limbe et en surface au niveau des ulcérations où les lames cornéennes sont à nu. Infiltration à prédominance monocyttaire de la base des procès ciliaires, léger exsudat albumineux dans la chambre antérieure et quelques cellules mononucléées et polynucléées en surface de l'épithélium postérieur. Conjonctive très enflammée, desquamant par endroits ou même ayant presque complètement disparu sous de grosses masses fibrino-leucocytaires ; le seul vestige en est alors une ligne de cellules pigmentaires reposant sur un chorion à infiltration polymorphe, très œdématisé et congestionné. Des bactéries sont visibles au bord des ulcères, soit en surface, sur ou dans les cellules épithéliales aplatis, soit dans le cytoplasme des cellules basales limitant ces ulcères.

7<sup>o</sup> Coupe n° 6 : quatre jours après l'inoculation, ulcération totale d'une cornée épaisse et œdématisée. On ne retrouve l'épithélium qu'à l'extrême bord au niveau du limbe, sur une très petite largeur. Infiltration à polynucléaires neutrophiles, totale mais faible, importante seulement en surface et à sa proximité. Les néo-vaisseaux commencent à apparaître à la périphérie, précédant de peu l'épithélium et se dirigeant obliquement vers la surface. La conjonctive est très infiltrée de polynucléaires, surtout superficiellement. Léger exsudat albumineux dans la chambre antérieure et quelques polynucléaires et mononucléaires sur l'épithélium postérieur. Des bactéries sont visibles en bordure de l'ulcère, dans le cytoplasme de cellules épithéliales superficielles. Certaines d'entre elles en sont boursées ; on en trouve aussi sur la conjonctive bulbaire. Le prélèvement fait au moment de l'énucléation donne une culture positive.

8<sup>o</sup> Coupe n° 17 : onze jours après l'inoculation, cornée épaisse par l'œdème et par un tissu conjonctif richement cellulaire où l'on reconnaît les restes des lames cornéennes. Cependant, dans une partie profonde subsiste l'organisation en lames parallèles dissociées par l'œdème. Néo-capillaires dans toute la cornée, prédominants en surface. Un épithélium recouvre la cornée, formé en profondeur de grosses cellules à volumineux noyau, claires et basophiles, cubiques ou allongées, reposant sur une mince vitrée, condensation éosinophile très irrégulière de dessin et d'épaisseur. En deux endroits, sur une courte longueur, cette couche basale est dissociée et difficile à suivre. Au-dessus existent deux ou trois couches de cellules plus aplatis, envahies par de nombreux leucocytes. Enfin, par place, traînent des masses d'exsudat fibrino-leucocytaire. Infiltration cornéenne polymorphe, mais à prédominance nette des polynucléaires neutrophiles. Conjonctive infiltrée par endroits ne montrant pas d'ulcération. Procès ciliaires et

espace de Fontana : pas d'infiltration. Chambre antérieure : pas d'excès d'humidité, pas de cellules. Les germes sont absents au niveau de la conjonctive et très rares dans les petites masses d'excès fibrino-leucocytaire. On les trouve en surface de l'épithélium, paraissant être dans des cellules épithéliales nécrosées, aplatis et fortement colorables, ou même dans des cellules en bon état apparent, et surtout en deux endroits où la couche épithéliale discontinue est difficile à suivre. On trouve enfin des cellules pigmentaires (chromatocytes et cellules épithéliales) parmi les cellules basales cornéennes, sauf au niveau du tiers moyen de la coupe. Culture positive.

9<sup>e</sup> Coupe n° 8 : trente-cinq jours après l'inoculation, le cobaye est mort spontanément. Processus d'évolution prolongée, sans tendance à la guérison. Cornée ayant trois fois l'épaisseur normale au centre, formée de lames œdématisées dans la profondeur, d'un tissu conjonctif jeune, richement cellulaire plus en surface, lui-même recouvert d'un excès fibrino-leucocytaire épais. Néo-capillaires rares et de petite taille dans la profondeur, nombreux et dilatés dans le tissu conjonctif jeune, qui est le siège d'une infiltration à prédominance de poly-nucléaires, surtout près de la surface. Au voisinage du limbe, par contre, la cornée a une épaisseur presque normale. Partant de ce limbe, et faisant suite à un épithélium conjonctival légèrement infiltré de poly-nucléaires, et reposant sur un chorion œdématisé, on trouve un épithélium cornéen formé d'une couche continue de grosses cellules basales cubiques, reposant sur une vitrée mince et peu distincte, recouverte de trois ou quatre couches de cellules plus aplatis et très infiltrées. Ces cellules basales s'amincissent, deviennent d'aspect fusiforme en coupe et subsistent seules, elles se perdent d'un côté dans l'excès fibrino-leucocytaire, tandis que de l'autre elles se continuent par un épithélium formé de plusieurs couches de cellules très aplatis, infiltrées, d'apparence nécrosée. Cette lame épithéliale disparaît elle-même vers le tiers central de la coupe cornéenne, siège d'une ulcération et occupé par un véritable granulome inflammatoire. Basale postérieure (membrane de Descemet) très épaisse. Beaucoup de noyaux de l'épithélium postérieur sont ovoïdes et non pas en croissant mince.

Pas de germes au niveau de l'épithélium conjonctival ou dans les leucocytes de l'excès. Quelques bactéries au voisinage de la bordure de progression épithéliale, dans ou sur des cellules aplatis ou nécrosées. Culture positive : une colonie. Nous verrons plus loin la coupe n° 1 (*Shiga*, un mois après l'inoculation) qui montre des lésions presque identiques.

L'examen des lésions d'âge varié obtenues avec d'autres souches complète ces résultats :

10<sup>e</sup> Coupe n° 2 (*Shiga* H.53.3234) : trois jours après l'inoculation, cornée épaissie, œdématisée. Infiltration leucocytaire totale ; ulcération presque complète, recouverte d'un excès fibrino-leucocytaire. À la périphérie, l'épithélium, sous forme d'une couche mince à deux assises de cellules, puis une seule, gagne en direction du centre, accompagné de néo-vaisseaux qui commencent à se développer. Au milieu de

l'ulcère, on retrouve une petite portion de tissu cornéen saillant et recouvert d'une couche monocellulaire d'épithélium. Dans la chambre antérieure, un léger précipité albumineux et quelques cellules poly- et mononucléées. Infiltration polymorphe, mais à prédominance de polynucléaires neutrophiles à la base des procès ciliaires, autour des espaces de Fontana. Conjunctive et chorion légèrement infiltrés. On voit des bactéries au centre de la cornée, dans le cytoplasme des cellules basales de l'ilot épithelial, et dans les cellules épithéliales en voie de nécrose qui le bordent. Culture positive.

11<sup>o</sup> Coupe n° 4 (*Shiga H.53.3234*) : huit jours après l'inoculation, cornée épaisse, œdème, tuméfaction et prolifération abondante des cellules conjonctivales. Des néo-vaisseaux se voient partout, de même qu'une infiltration à polynucléaires peu dense sauf au niveau du limbe scléro-cornéen, et surtout dans la région centrale de la cornée, siège d'une ulcération. On trouve là un tissu de granulation, un bourgeon charnu, recouvert d'un exsudat fibrino-leucocytaire. L'épithélium antérieur reformé à la périphérie gagne en pointe sous forme d'une lame mince, unicellulaire, aplatie, sous une partie de l'exsudat. Plus on s'éloigne de l'ulcère, plus le nombre de couches cellulaires augmente. La présence de cellules basales chargées de pigment fait ressembler cet épithélium à celui d'une conjonctive bulbaire. La basale de Bowman est indistincte. Rares leucocytes dont quelques éosinophiles vrais au niveau des procès ciliaires. Des bactéries Gram-négatives sont visibles en amas au milieu des cellules épithéliales nécrosées dans l'exsudat de l'ulcère qui avoisine le bord de progression épithéliale. Culture positive.

12<sup>o</sup> Coupe n° 1 a (*Shiga H.53.4518*) : un mois après l'inoculation. Ici encore, le cobaye est mort spontanément sans guérison oculaire. Les lames de la cornée épaisse sont dissociées par l'œdème ; elles contiennent quelques néo-capillaires, sont recouvertes d'un tissu conjonctif jeune qui est plus cellulaire dans la partie centrale où de nombreux néo-capillaires forment de véritables lacs sanguins sous la surface. Au milieu du limbe, il y a aussi des néo-vaisseaux très dilatés. Infiltration dense, à polynucléaires neutrophiles au voisinage de la surface. A un épithélium conjonctival reposant sur un chorion œdématisé, siège d'une infiltration légère, fait suite un épithélium dont la couche basale a des noyaux arrondis et contient aussi de grosses cellules pigmentaires. Il se termine très vite d'un côté de la cornée par de grosses cellules basales cubiques et basophiles sous une mince couche d'exsudat. De l'autre côté, il se continue par plusieurs couches de cellules très aplatis qui, en se rapprochant de la zone centrale, s'infiltrent de polynucléaires et l'épithélium devient indistinct dans une masse saillante d'exsudat fibrino-leucocytaire, qui occupe la partie centrale de la cornée. Cependant, persistent encore quelques cellules pigmentaires en ligne (mélanoblastes) qui semblent le continuer, comme si un épithélium reformé s'était secondairement nécrosé. La face interne de la cornée est déformée par de larges ondulations, que suit une membrane de Descemet épaisse. L'épithélium postérieur est gonflé et ses noyaux sont ovoïdes et non en croissant. Pas d'exsudat ou de cellules dans la chambre antérieure ; quelques cellules rondes (plasmocytes et

mononucléaires) à la base des procès ciliaires. On trouve quelques coques et bacilles à Gram-positif en surface de l'exsudat, et quelques bacilles à Gram-négatif, groupés, qui sont peut-être des *Shigella* (l'ensemencement était positif une semaine avant la mort, mais n'a pas été refait ensuite). Nous avons déjà signalé la ressemblance de cette coupe avec le n° 8.

13<sup>e</sup> Coupe n° 1 b : l'autre œil de ce cobaye, infecté spontanément après l'inoculation, avait suivi une évolution d'abord parallèle, mais bien différente ensuite, puisque, au moment de la mort, une coupe le montre en voie de guérison : l'épithélium est entièrement reformé, à plusieurs couches dont une basale à noyaux arrondis, à cellules pigmentaires assez nombreuses (mélanoblastes et mélanophores) reposant sans vitrée nette sur un tissu conjonctif très cellulaire et riche en néo-capillaires, qui recouvre des lames cornéennes encore gonflées d'œdème.

14<sup>e</sup> Coupe n° 7 (Boyd 4 : Tunis 496) : huit jours après l'inoculation, cornée très épaisse, œdème, infiltration leucocytaire totale et légère, nettement plus dense en surface. Ulcération du tiers central, recouverte d'un exsudat mince. L'épithélium progresse sous forme d'une lame très infiltrée à quelques couches de cellules basophiles, très colorables, sous un léger exsudat, et se perd indistinctement d'un côté ; de l'autre une couche de cellules basales cubiques énormes, recouvertes d'une ou deux couches de cellules aplatis, disparaît presque brutalement en bordure de l'ulcère. Les néo-vaisseaux, abondants et dilatés, ont parcouru les deux tiers du chemin vers le centre ; leur avant-garde est à la hauteur de l'arrêt de l'épithélium. Très léger précipité albumineux et quelques rares cellules dans la chambre antérieure ; légère infiltration par polynucléaires, lymphocytes et plasmocytes autour des espaces de Fontana. La conjonctive au voisinage du limbe est encore très infiltrée. Des bactéries sont visibles en plusieurs endroits dans des cellules aplatis et fortement colorables de la surface de l'épithélium cornéen ou conjonctival au voisinage du limbe. Culture positive.

15<sup>e</sup> Coupe n° 3 (Flexner I, Brazza n° 286) : trois jours après l'inoculation, cornée légèrement épaisse, œdématisée, totalement infiltrée par des polynucléaires ; ulcération presque complète, recouverte par un exsudat fibrino-leucocytaire peu épais. On ne retrouve l'épithélium antérieur qu'à la périphérie, soit sous forme d'une lame monocellulaire d'assez grosses cellules cubiques s'insinuant sous une couche légère d'exsudat, soit sous forme d'une lame à trois ou quatre assises de cellules aplatis, légèrement infiltrées, se terminant brusquement en bourrelet au bord de l'ulcère. Les néo-vaisseaux sont encore cantonnés à la périphérie, peu nombreux et légèrement en retrait par rapport à la progression de l'épithélium. Un peu de précipité albumineux dans la chambre antérieure ; quelques cellules (polynucléaires et mononucléaires) à la surface de l'épithélium postérieur. Petite infiltration à prédominance de neutrophiles des espaces de Fontana. La conjonctive présente un aspect et une infiltration leucocytaire quasi normale. Pas de bactéries visibles. Culture positive.

16<sup>e</sup> Coupe n° 5 (Flexner 4 a, coll. I. P. 5224) : quatorze jours après l'inoculation, cornée très épaisse, œdème, infiltration totale, peu dense. Ulcération occupant la partie centrale de la cornée, recouverte d'un

exsudat leucocytaire mince. L'épithélium se retrouve d'un côté sous forme d'une lame de cellules aplatis basophiles, qui se termine insensiblement sous l'exsudat par une nappe monocellulaire. De l'autre côté, on voit un épithélium à plusieurs couches, dont une basale à cellules cubiques, basophiles et des cellules acidophiles, très minces en surface ; puis les cellules basales disparaissent et seule une lame à quelques assises de ces cellules acidophiles, recouverte d'un exsudat fibrino-leucocytaire discret, s'étend beaucoup plus loin et finit par se perdre indistincte et d'apparence nécrosée dans l'exsudat de la surface de l'ulcère. Les néo-vaisseaux ont presque atteint le centre de la cornée. Il y a un léger précipité albumineux dans la chambre antérieure. L'épithélium conjonctival est mince, ses cellules superficielles sont dissociées et desquamées, ce qui le réduit par endroits à la couche basale. Son chorion est cédématié et présente une très faible infiltration leucocytaire. Pas de bactéries visibles. Culture positive.

17<sup>e</sup> Coupe n° 15 (Flexner 4 c spécifique) : quarante jours après l'inoculation (pl. III, fig. 17), la cornée est redevenue transparente, elle est d'épaisseur moindre au centre que du côté sain (pl. I, fig. 1). Un épithélium continu la recouvre ; à part quelques cellules pigmentaires (mélanoctytes et mélanoctones) sur un tiers de largeur à partir du limbe, son aspect est quasi normal. Au centre, par contre il est très mince, car les cellules de ses trois ou quatre couches sont aplatis, même celles de la basale dont les noyaux sont orientés parallèlement à la surface. La membrane basale, fine, est très souvent déformée par de petits néo-vaisseaux qui subsistent encore sous elle, à l'endroit où l'épithélium est de faible épaisseur (on n'en retrouve pas dans le reste de la cornée, sauf au niveau du limbe où ils sont encore plus nombreux que dans l'œil sain). Aucune infiltration leucocytaire du tissu cornéen ou des espaces de Fontana. Conjonctive normale. Pas d'exsudat ou de cellules dans la chambre antérieure. Culture négative.

18<sup>e</sup> Coupe n° 16 (Sonne Cl. phase I) : seize jours après l'inoculation. La cornée est redevenue transparente. La structure de la coupe est analogue à celle du n° 15 (y compris la présence de cellules chargées de pigment dans l'épithélium). Culture négative.

#### PLANCHE I. — Coloration hématéine-éosine.

- FIG. 1. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  ; coupe n° 15 : cornée saine.
- FIG. 2. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  ; coupe n° 13 : vingt-quatre heures, ulcération au début, désunion des cellules épithéliales.
- FIG. 3. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  ; coupe n° 13 : vingt-quatre heures, autre ulcération au début, près du limbe, infiltration leucocytaire sous-jacente.
- FIG. 4. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  ; coupe n° 13 : vingt-quatre heures, autre aspect de la même ulcération, montrant deux cellules pédales.
- FIG. 5. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  ; coupe n° 13 : vingt-quatre heures, le limbe, début de l'infiltration leucocytaire de la cornée.
- FIG. 6. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  ; coupe n° 14 : trente-six heures, cornée en grande partie ulcérée, flot d'épithélium au centre de la figure.



1



2



3



4



5



6

PLANCHE I.

## PLANCHE II

Fig. 7. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 14 : trente-six heures, le bord du même îlot, montrant aussi la transformation et la disparition de la basale de Bowman.

Fig. 8. — Object.  $\times 100$ . Gross. final  $\times 620$  (thionine phéniquée) ; coupe n° 14 : trente-six heures, le bord d'un autre îlot, progression de l'ulcère, élimination de cellules contenant des bactéries.

Fig. 9. — Object.  $\times 100$ . Gross. final  $\times 620$  (Mann-Dominici) ; coupe n° 14 : trente-six heures, dans un îlot d'épithélium, la vacuolisatation des espaces inter-cellulaires.

Fig. 10. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 14 : trente-six heures, coulée de cellules cubiques sous l'exsudat près du limbe.

Fig. 11. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  (hématine-éosine) ; coupe n° 6 : quatre jours, la cornée entièrement ulcérée, leucocytes en surface, quelques cellules dans la chambre antérieure.

Fig. 12. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  (hématine-éosine) ; coupe n° 6 : quatre jours, au voisinage du limbe l'apparition des néo-vaisseaux.

Fig. 13. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 6 : quatre jours, au niveau du limbe, l'épithélium du bord de l'ulcération.

Fig. 14. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  (hématine-éosine) ; coupe n° 17 : onze jours, néo-vaisseaux ; l'épithélium reformé, ligne de grosses cellules basales, infiltration de surface.

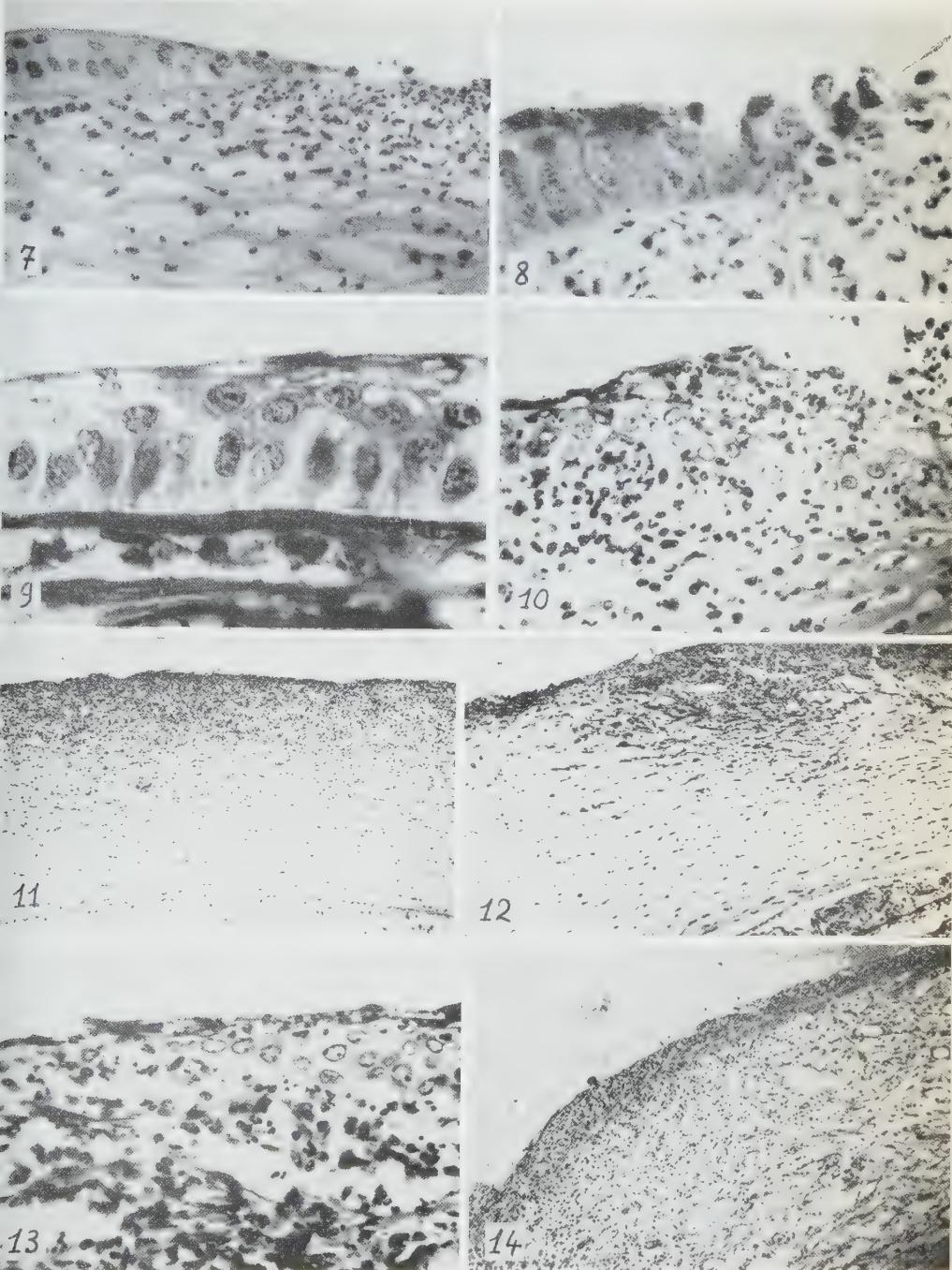


PLANCHE II.

### PLANCHE III

FIG. 15. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 17 : onze jours, l'épithélium reformé avec une couche basale de grosses cellules ; un mélanoblaste se voit à droite empiétant partiellement sur un noyau. Infiltration et exsudat fibrino-leucocytaire en surface.

FIG. 16. — Object.  $\times 100$ . Gross. final  $\times 620$  (thionine phéniquée) ; coupe n° 17 : onze jours, la couche épithéliale basale se dissocie en un point et les cellules prennent un aspect fusiforme (deux cellules nécrosées contiennent des bactéries voir fig. 25).

FIG. 17. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 15 : quarante jours, cornée redevenue transparente ; épithélium mince contenant des cellules pigmentaires ; quelques néo-capillaires subsistant sous l'épithélium.

FIG. 18. — Object.  $\times 40$ . Gross. final  $\times 240$  (hématine-éosine) ; coupe n° 8 : trente-cinq jours. Le cobaye est mort, l'ulcération cornéenne persistait ; coulée de cellules épithéliales fusiformes qui se perdent dans un granulome inflammatoire central.

FIG. 19. — Object.  $\times 10$ . Gross. final  $\times 60$  (hématine-éosine) ; même coupe : vue générale montrant l'épithélium postérieur et la membrane de Descemet. les lames cornéennes recouvertes d'un tissu conjonctif jeune riche en néo-capillaires et le granulome de la région ulcérée.

FIG. 20. — Object.  $\times 100$ . Gross. final  $\times 620$  (thionine phéniquée) coupe n° 13 : vingt-quatre heures, ulcération au début ; nombreuses bactéries dans le cytoplasme d'une cellule basale et de deux cellules pédales qui l'encaadrent.

FIG. 21. — Gross. final  $\times 1500$ , même figure plus agrandie.

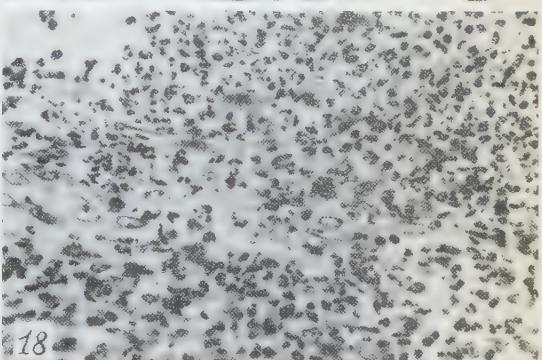
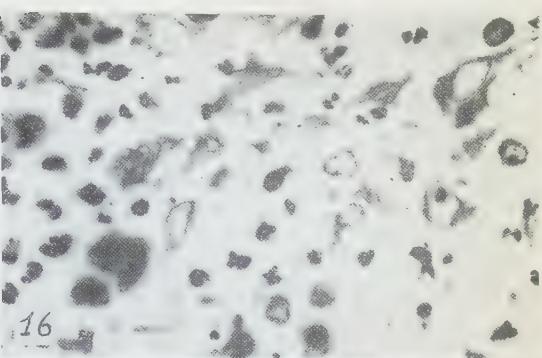
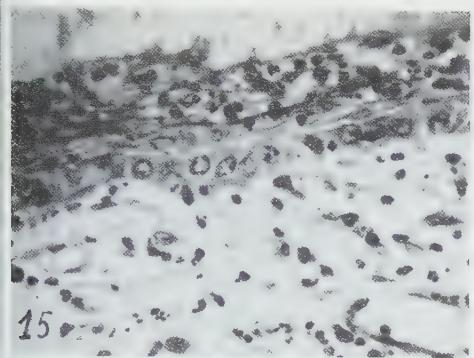


PLANCHE III.

#### PLANCHE IV

Fig. 22. — Object.  $\times 100$ , Gross. final  $\times 1500$  (thionine-phéniquée), coupe n° 14 : trente-six heures, bord de progression de l'ulcération (même champ que fig. 8) ; fort grossissement montrant des bactéries dans le cytoplasme des cellules épithéliales.

Fig. 23. — Object.  $\times 100$ , Gross. final  $\times 620$  (thionine phéniquée), coupe n° 6 : quatre jours, au voisinage du limbe, bactéries dans des cellules épithéliales de surface.

Fig. 24. — Gross. final  $\times 1500$  : même figure plus agrandie montrant les bactéries.

Fig. 25. — Object.  $\times 100$ , Gross. final  $\times 1500$  (thionine phéniquée), coupe n° 17 : onze jours, figure 16 agrandie pour montrer les bactéries dans deux cellules épithéliales profondes, en pointe des cellules épithéliales fusiformes.

Fig. 26. — Object.  $\times 100$ , Gross. final  $\times 620$  (May-Grünwald-Giemsa) : exsudat conjonctival (Boyd 4, Tunis 530, sept jours) ; polynucléaires ; une cellule épithéliale en voie de nécrose contenant des bactéries.

Fig. 27. — Même grossissement, même coloration : exsudat cornéen obtenu par grattage (Q 1030, Tunis 513, six jours) ; polynucléaires, hématies, une cellule épithéliale nécrosée contenant des bactéries.

Fig. 28. — Même grossissement, même coloration : exsudat conjonctival (Boyd 4, Tunis 530, sept jours) ; polynucléaires, une cellule épithéliale à cytoplasme basophile, probablement cellule basale, contenant une bactérie.

Fig. 29. — Même grossissement, même coloration : exsudat conjonctival (Boyd 4, Tunis 530, sept jours) ; une cellule épithéliale à cytoplasme basophile contenant des bactéries.

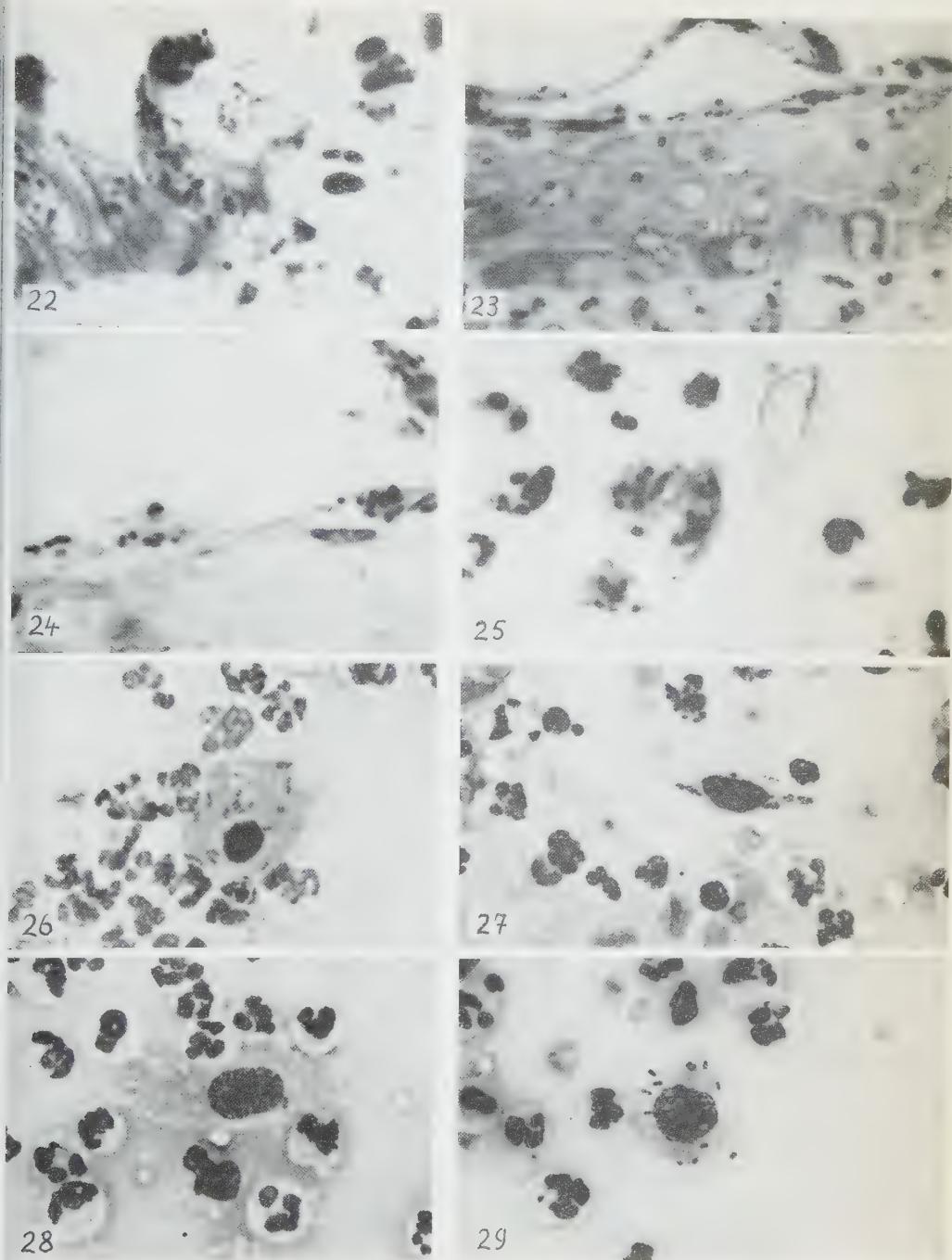


PLANCHE IV.



Sur ces données on peut essayer de reconstruire une évolution. Notons d'abord que rien ne permet de savoir quelle *Shigella* est à l'origine de la lésion (*Sh. dysenteriae*, *flexneri*, *boydii* ou *sonnei*.)

*L'ulcération.* Si des altérations de l'épithélium cornéen commencent à être visibles dès la neuvième heure (coupe n° 11), c'est à la dix-huitième heure qu'elles sont déjà nettes, sous forme d'une desquamation des cellules superficielles, qui se condensent, s'aplatissent et se désunissent, de sorte qu'à cet endroit l'épithélium diminue d'épaisseur. A la vingt-quatrième heure on peut mieux suivre encore les modifications qui aboutissent à la formation des ulcères : desquamation superficielle de cellules devenues très colorables, vacuolisation du cytoplasme, gonflement et vacuo-lisation des espaces intercellulaires, condensation et rétraction nucléaires (pl. I, fig. 2, et pl. II, fig. 9). Les cellules épithéliales, finalement nécrosées et libérées, laissent à nu le tissu cornéen. Puis les ulcères progressent par leurs bords (pl. II, fig. 7 et 8). A la trente-sixième heure, il reste encore dans la coupe n° 14 des îlots d'épithélium (pl. I, fig. 6, et pl. II, fig. 7) ; aux troisième et quatrième jours l'ulcération est complète (pl. II, fig. 11), et ce n'est qu'à la périphérie, au voisinage du limbe scléro-cornéen, qu'on retrouve un épithélium (pl. II, fig. 13).

*La réaction leucocytaire.* On voit quelques polynucléaires traverser la conjonctive à la dix-huitième heure (coupe n° 12). La conjonctive à la vingt-quatrième heure est plus infiltrée et de petites masses fibrino-leucocytaires restent accrochées à sa surface près du limbe, tandis que déjà de nombreux polynucléaires commencent à pénétrer entre les lames cornéennes à ce niveau, avançant plus rapidement sous l'épithélium (pl. I, fig. 5), s'assemblant même à distance sous une ulcération proche (pl. I, fig. 3 et 4) ; ils ont envahi la presque totalité de la cornée à la trente-sixième heure, plus nombreux près de la surface qu'en profondeur, cependant que, par œdème, les lames de cet élément se gonflent et s'écartent, ce qui entraîne une augmentation progressive de son épaisseur.

*La basale antérieure de Bowman* se gonfle d'abord et devient très nette, puis, lorsque l'épithélium qui la recouvrail a disparu, elle est traversée par les leucocytes, dissociée, et sa structure disparaît dans l'exsudat fibrino-leucocytaire qui recouvre alors l'ulcération (cette transformation peut se voir nettement sur la figure 7).

*Les néo-capillaires* commencent à se développer au niveau du limbe vers le troisième jour, plus nombreux et avançant plus vite près de la surface antérieure (coupes n° 6, n° 2, n° 3). La figure 12 les montre au quatrième jour. Ils pourront avoir atteint le centre de la cornée au huitième jour (coupe n° 4), ou ne pas y être

encore arrivés tout à fait au quatorzième jour (coupe n° 5). Entre les lames cornéennes les plus superficielles, les cellules conjonctives se tuméfient, se multiplient et édifient un tissu conjonctif jeune, riche en cellules et en capillaires qui contribue, presque à lui seul, à l'augmentation d'épaisseur de la cornée. Une tendance à la *réparation épithéliale* peut débuter alors que l'ulcération n'est pas même terminée et devient manifeste avec l'apparition de néo-vaisseaux, qui semblent accompagner l'épithélium en le précédant de peu. Celui-ci progresse d'abord sous forme d'une couche unique de grosses cellules à cytoplasme basophile clair, qui se fraient un passage sous l'exsudat fibrino-leucocytaire, recouvrant l'ulcération et comme sous sa protection (pl. II, fig. 10). Parfois les cellules, à l'extrême pointe de progression, prennent un aspect fusiforme qui les ferait ressembler à des cellules conjonctives (pl. III, fig. 16), si l'on ne voyait avec évidence les transitions de ce type avec celui de grosses cellules basales. Puis la structure à plusieurs couches se constitue, dont les plus superficielles sont encore infiltrées de polynucléaires (pl. II, fig. 13, 14, et pl. III, fig. 15). De loin en loin, parmi les cellules de la couche basilaire de l'épithélium, qui s'est reconstitué ainsi, on peut voir, soit des mélanoblastes allongés, soit des cellules épithéliales, contenant des grains de pigment (pl. III, fig. 15). Une guérison clinique peut se produire en seize jours (coupe n° 16), en quarante jours (coupe n° 15) : la cornée paraît avoir retrouvé une transparence normale. L'infiltration leucocytaire a disparu ; quelques néo-capillaires subsistent, surtout sous l'épithélium, dont ils déforment la membrane basale, fine et irrégulière de dessin. L'épithélium à plusieurs couches est mince et on y trouve toujours des cellules chargées de pigment mélanique. L'ensemble a un aspect un peu atrophié (pl. III, fig. 17). Nous avons pu observer aussi une absence de guérison au bout de trente-cinq jours (coupe n° 8) et un mois (coupe n° 1 a) : infiltration leucocytaire, néo-capillaires, tissu conjonctif jeune persistent ; un granulome inflammatoire saillant dans lequel se perd l'épithélium occupe le tiers central de la surface cornéenne (pl. III, fig. 18 et 19).

*L'inflammation de la conjonctive*, surtout dans la région avoisinant le limbe, est un phénomène précoce : infiltration à polynucléaires de l'épithélium, congestion, œdème de la sous-muqueuse, augmentation de volume des formations lymphoïdes en sont les manifestations qui peuvent se prolonger quelques jours et même s'accompagner d'ulcération (coupe n° 14), mais ces lésions restent légères et surtout variables en intensité, à côté de la régularité et de l'intensité de celles de la cornée, même dans les évolutions prolongées (coupes n° 8 et n° 1 a) ; elles semblent en quelque sorte accessoires.

Dans le reste du segment antérieur de l'œil, nous avons noté aussi, à partir de la trente-sixième heure, l'apparition d'un léger précipité albumineux, puis quelques cellules polynucléées et mononucléées au troisième jour dans la chambre antérieure ; la région comprenant la base des procès ciliaires et les espaces de Fontana s'infiltra faiblement (polynucléaires, puis lymphocytes, monocytes, plasmocytes). Ces minimes réactions ont disparu habituellement avant le quinzième jour, sauf dans la coupe n° 1, où quelques mononucléaires et plasmocytes subsistent à la base des procès ciliaires. Dans le segment postérieur de l'œil, nous n'avons remarqué aucune lésion.

*Existence et localisation des bactéries.* Aucune coupe ne présente de signes d'infection secondaire, même la coupe n° 1, où il y a quelques coques et bacilles Gram-positifs dans l'exsudat, qui doivent être de simples saprophytes. La facilité d'obtention des *Shigella* en culture pure à partir des lésions souligne d'ailleurs la propreté de l'infection. Dans les premières heures après l'inoculation, on ne voit aucun germe. Lorsque les lésions histologiques ont commencé à se constituer, on ne trouve pour ainsi dire pas de bacilles Gram-négatifs, pouvant être des *Shigella*, dans l'exsudat fibrino-leucocytaire. En surface de la conjonctive, nous n'en avons trouvé que dans deux coupes (n° 6, quatre jours, et n° 7, huit jours). Par contre, l'examen, qui dut parfois être attentif, de presque toutes les lésions cornéennes nous a révélé des bactéries. Des figures illustrent leur localisation dans les ulcères au début (pl. III, fig. 20 et 21), sur les bords de leur progression (pl. IV, fig. 22), en surface de l'épithélium de réparation (pl. IV, fig. 23 et 24), sur sa marge d'extension, ou bien enfin là où il paraît progresser avec peine (pl. IV, fig. 25). Nous insistons sur leur situation intracytoplasmique, déjà notée dans les comptes rendus ; elles sont incluses, soit dans des cellules épithéliales nécrosées, très colorables, de surface ou libérées dans l'exsudat, soit dans des cellules claires et basophiles de la couche basale en pointe de progression. Frappés par cette constatation et aussi par la rareté ou même l'absence de bactéries à la surface de la cornée ou de la conjonctive lorsque les lésions débutent, avec un apport important de germes par l'inoculation, nous avons coloré au Giemsa des frottis de l'exsudat à intervalles dans deux expériences avec la souche de Boyd 2 (56-352). Voici ce que l'on peut observer : dans les deux ou trois premières heures les bactéries sont très nombreuses, paraissant même se multiplier ; il n'y a alors pratiquement pas de leucocytes et seulement de rares cellules épithéliales. Vers la quatrième heure, les polynucléaires commencent à apparaître ; leur nombre augmente alors très vite, tandis que celui des bactéries tend à diminuer progressivement, bien qu'on voie peu d'images de phagocytose neutrophile. A la

quatorzième et encore mieux à la vingt-deuxième heure, les leucocytes sont devenus extrêmement nombreux, nombreuses aussi les cellules épithéliales isolées ou en placards ; par contre, les germes sont rares, isolés ou parfois à l'état d'unité dans des leucocytes, mais on trouve quelques cellules épithéliales qui en contiennent et même peuvent en être bourrées. Enfin, au bout de quatre jours ce même aspect est encore plus net, et en fait les germes sont difficiles à trouver en dehors de quelques cellules épithéliales qui peuvent en contenir de nombreux. Les figures 26, 27, 28 et 29 montrent de telles cellules d'exsudats conjonctival (Boyd 4, sept jours) ou cornéen (Q 1030, six jours) obtenus avec deux autres souches. On voit donc que les leucocytes viennent d'abord de la conjonctive facilement traversée (puisque'ils ne peuvent venir de la cornée qu'après vingt-quatre heures) ; qu'à partir de leur apparition, le nombre des germes diminue, bien que leur rôle phagocytaire paraisse faible ; et enfin que le dernier refuge des germes est le cytoplasme des cellules épithéliales, pour la plupart d'origine cornéenne, dans lesquelles ils paraissent même se multiplier, ce que nous avions d'abord remarqué avec étonnement dans les coupes et qu'est venu confirmer la méthode des frottis très favorable à la cytologie. Si on ne trouve pas de bactéries à la surface des coupes dans les premières heures suivant l'inoculation, c'est que l'exsudat séreux est facilement lavé par le fixateur. Lorsqu'on commence à trouver des amas de leucocytes restés collés sur l'œil, les bactéries sont devenues assez rares pour que l'on n'ait presque aucune chance d'en trouver dans une coupe, sauf au niveau de leur refuge épithelial. Il est à remarquer d'ailleurs que les ulcération commencent quand les bactéries ont presque disparu de l'exsudat.

Les coupes n'apprennent rien sur la forme de ces ulcération. Suivant la formule ophtalmologique nous avons préparé une solution de fluorescéine (fluorescéine, 2 g ; carbonate de lithium, 3,5 g ; eau distillée, 100 ml). Une goutte en est instillée dix-sept heures après l'inoculation dans l'œil d'un cobaye, et vingt-quatre heures après l'inoculation dans l'œil de deux autres cobayes [Boyd 2 (56-352)].

Chez le premier une ulcération centrale de très petite taille se colore ; chez les deux autres plusieurs ulcération apparaissent avec une grande netteté, les unes à peine visibles, les autres dépassant 1 mm de diamètre, régulièrement arrondies, sans profondeur et réparties au hasard. Au bout de quarante-huit heures la cornée déjà laiteuse s'est colorée entièrement et faiblement. Cette méthode confirme donc bien ce que nous savions de la date d'apparition des ulcères et nous renseigne sur leur répartition et leur forme.

## RÉSUMÉ.

Après étude histologique de 18 coupes d'œil de cobayes qui avaient été inoculés avec différentes espèces de *Shigella* (*Sh. dysenteriae*, *Sh. boydii*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*) et examinées à des stades variés, on peut conclure à l'identité des lésions obtenues avec ces souches. Il s'agit d'une kérato-conjonctivite ulcéreuse dans laquelle l'élément kératite est beaucoup plus important que l'élément conjonctivite. Nous avons pu mettre en évidence la localisation des bactéries dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Cette lésion expérimentale peut donner des informations intéressantes sur le mécanisme de la formation des ulcères et de leur réparation (29 photographies illustrent le texte).

## SUMMARY

HISTOLOGICAL STUDY OF THE EVOLUTION OF KERATO-CONJUNCTIVITIS INDUCED IN GUINEA-PIGS BY *Shigella dysenteriae*.

An histological survey of 18 sections of guinea-pig eyes inoculated with different *Shigella* species (*Sh. dysenteriae*, *Sh. boydii*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*) studied at varied stages, shows identity of lesions. It is an ulcerous kerato-conjunctivitis in which keratitis is much more important than conjunctivitis. The bacteria are localized in the cytoplasm of epithelial cells. This experimental lesion might reveal interesting facts on the mechanism of corneal ulcer production and restoration (29 photographs with the text).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SZTURM-RUBINSTEIN (Szymona), PIÉCHAUD (Danielle) et THIBAULT (Pierre). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 463.
-

**ÉTUDE DE QUELQUES SOUCHES  
DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
ISONIAZIDO-RÉSISTANTES  
ET FORTEMENT PATHOGÈNES POUR LE COBAYE**

PREMIER MÉMOIRE  
**DESCRIPTION DES SOUCHES**

par Conrad LIBERMANN (\*) (\*\*) .

(Institut Pasteur, Service de Recherches sur la Tuberculose  
[Chef de Service : Dr JEAN BRETEY])

INTRODUCTION.

L'atténuation du pouvoir pathogène des bacilles isoniazido-résistants est une des constatations les plus importantes que l'on ait faites depuis la découverte de l'isoniazide. Elle avait été observée dès 1952 chez le cobaye par Tuczek et Saupe, en Allemagne [16], et en 1953 par Barnett, Bushby et Mitchison [1], Middlebrook et Cohn [10 a], Steenken et Wolinsky [15], Nitti et Tanzi [12] et, en France, par nous-même [7].

Depuis lors, elle est devenue une notion classique. Mais ses limites restaient à déterminer : cette atténuation était-elle générale, s'étendant à tous les hôtes et à tous les bacilles tuberculeux isoniazido-résistants ? Restait-elle au contraire particulière au cobaye et à certaines souches isoniazido-résistantes seulement ? Ou même se limitait-elle à une partie des bacilles qui constituaient ces souches ?

Lorsque, avec Rist, Grumbach et Levaditi [8, 14], nous avons éprouvé sur le cobaye une première série de 38 souches (1) de bacilles tuberculeux isoniazido-résistants, nous avons constaté que

(\*) Attaché de Recherches au C. N. R. S.

(\*\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 novembre 1957.

(1) Nous employons ici le mot « souches » dans un sens très large : il s'agit de populations bacillaires provenant d'une même expectoration ou d'une même culture, et non d'une seule colonie, sauf indication contraire.

29 seulement d'entre elles, soit 76 p. 100, présentaient un pouvoir pathogène nettement atténué, c'est-à-dire qu'elles provoquent chez le cobaye une tuberculose plus ou moins généralisée, mais spontanément régressive. Les 9 autres souches présentaient un pouvoir pathogène *normal*, c'est-à-dire qu'elles provoquaient une tuberculose généralisée progressive et mortelle.

Dans les lésions viscérales des cobayes inoculés avec 5 de ces dernières souches, on retrouvait une immense majorité de bacilles sensibles, que ce passage sur l'animal avait sélectionnés et qu'on peut rendre responsables de ces lésions. Les bacilles isoniazido-résistants avaient disparu pour la plupart.

Mais dans le cas des 4 autres souches fortement pathogènes : BR. I, DEM., DID. II et GO, et aussi de plusieurs souches analogues que nous avons eu l'occasion d'étudier par la suite : TIL. I, TIL. II, JOU. I, JOU. II, on retrouvait dans les lésions une population bacillaire de même résistance que la souche inoculée. Tout se passait comme s'il existait des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide et en même temps très pathogènes pour le cobaye.

Nous n'étions pas les seuls à le remarquer.

Ainsi, dès 1953, Barnett, Bushby et Mitchison [1] décrivent une souche totalement résistante à 1 µg d'isoniazide et cependant virulente pour le cobaye. Mitchison en décrira d'autres par la suite [11].

Middlebrook et Cohn [10 a] affirment que la résistance des bacilles tuberculeux à 1 µg d'isoniazide n'est pas constamment associée à une atténuation significative de la virulence, alors que la résistance à 10 µg l'est.

Steenken et Wolinsky [15] remarquent que l'isoniazido-résistance et la perte de virulence pour le cobaye ne vont pas toujours de pair : sur les 9 cultures qu'ils trouvent pleinement virulentes, 6 sont isoniazido-résistantes. Reste à montrer si, dans les cas de Steenken et Wolinsky, la virulence des souches isoniazido-résistantes est vraiment due aux bacilles résistants eux-mêmes.

Par la suite, Jensen [6] constate que, sur 34 souches provenant de 25 malades et toutes *au moins* trente-deux fois plus isoniazido-résistantes que la souche normale E<sub>5</sub>, 19 ont pratiquement la même virulence que cette souche normale. Et pourtant, 7 de ces souches virulentes sont cent vingt-huit fois plus résistantes que la souche de référence E<sub>5</sub>; et une, au moins cinq cent douze fois plus.

Gernez-Rieux, Tacquet, Voisin et Fabre [5], étudiant 33 souches résistantes à 5 µg au moins d'isoniazide, provenant de colonies isolées, cultivées sur milieux contenant de l'isoniazide à un taux de 5 µg et ne comportant par conséquent que des bacilles isonia-

zido-résistants, ont constaté que 5 de ces souches, soit 15 p. 100, provoquaient encore, chez le cobaye inoculé par voie sous-cutanée avec une dose de 0,3 mg, une tuberculose généralisée. Et la culture des organes atteints montrait que les lésions viscérales contenaient bien des populations bacillaires totalement résistantes à 5 µg d'isoniazide.

Sur 125 souches isoniazido-résistantes provenant de malades traités depuis trois à dix-huit mois par la chimiothérapie, Etienne Bernard, Boris Kreis et Le Joubiou [2] en trouvent encore 75 normalement virulentes, soit 60 p. 100. Mais, sur les 45 souches dont ils ont fait précéder l'inoculation par un passage sur milieu contenant de l'isoniazide, ils n'en trouvent plus que 8 normalement virulentes, soit 17,7 p. 100, dont aucune ne résiste à plus de 5 µg d'isoniazide.

Gertrud Meissner [9], sur 120 souches totalement résistantes à 10 µg d'isoniazide, n'en trouve qu'une seule encore virulente pour le cobaye. Mais, sur 71 souches totalement résistantes à 0,1 µg d'isoniazide et sensibles à 1 µg, vingt-neuf sont encore virulentes ; et sur 16 souches totalement résistantes à 1 µg d'isoniazide et sensibles à 10 µg, huit sont virulentes, c'est-à-dire la moitié. On voit que l'aspect du problème change complètement suivant que l'on considère comme significatif un seuil de résistance plus ou moins élevé.

C'est ce que feront remarquer Enno Freerksen et Gertrud Meissner eux-mêmes dans leur rapport à la XIV<sup>e</sup> Conférence Internationale de la Tuberculose [4]. Les contradictions apparentes entre chercheurs, diront-ils, ne proviennent que de l'inobservation des trois conditions suivantes :

1<sup>o</sup> Définition précise de la notion de résistance ; 2<sup>o</sup> élimination de tous les bacilles sensibles du sein des souches étudiées ; 3<sup>o</sup> adoption d'une dose d'inoculation bien choisie.

Si ces conditions sont strictement observées et si le nombre de souches étudiées est suffisant (eux-mêmes en ont inoculé 672), on doit constater une corrélation évidente entre le degré d'isoniazido-résistance et l'atténuation de la virulence pour le cobaye. Ce n'est pas qu'il existe un taux limite d'isoniazido-résistance en deçà duquel toutes les souches sont virulentes et au-delà duquel elles sont toutes atténueées, mais au fur et à mesure que l'isoniazido-résistance augmente, le pourcentage des souches virulentes diminue.

*Il n'est donc pas question de discuter l'existence des souches à la fois isoniazido-résistantes et virulentes pour le cobaye, mais leur fréquence.* Et si elles sont rares, cela ne signifie pas qu'elles manquent d'intérêt. Bien au contraire, puisque, en clinique, ce sont celles-là qui risquent de devenir les plus dangereuses. C'est

pourquoi nous estimons utile de décrire le comportement à longue échéance de quelques-unes de ces souches, dont nous venons de montrer qu'elles ne sont pas si exceptionnelles et que nous avons suivies au laboratoire pendant plusieurs années.

A l'heure actuelle, nous avons examiné 106 populations bacillaires isoniazido-résistantes, dont 18 paraissent susceptibles d'être considérées comme virulentes par leurs bacilles résistants. Mais, dans ce premier mémoire, nous décrivons uniquement celles que nous avons étudiées assez longtemps pour connaître de façon très précise leurs propriétés et l'évolution de ces propriétés.

Il s'agit des souches DEM., TIL. II, GO. et BR. I.

#### TECHNIQUES.

Nous avons suivi chacune de ces quatre souches pendant au moins deux ans, en faisant alterner de diverses façons les repiquages *in vitro* et les réinoculations au cobaye. Nous en donnons des exemples plus loin. Nos techniques ont déjà été décrites en détail par ailleurs [13, 14].

Rappelons que les cultures sont effectuées sur milieu solide de Loewenstein modifié par Jensen et les titrages d'isoniazido-résistance, sur ce même milieu solide par la méthode de Coletsos [3], mais avec des ensements suffisamment faibles pour qu'il soit possible de compter les colonies [8, 14]. Les taux d'isoniazide utilisés dans les titrages sont les suivants :

0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 et 10 µg/cm<sup>2</sup> (2).

L'utilisation d'un second tube témoin permet de contrôler la régularité de l'ensemencement.

Les cobayes sont inoculés par voie sous-cutanée, dans la région inguinale. Nous effectuons d'abord une inoculation de 0,5 mg de bacilles (poids humide) provenant d'une culture homogène en milieu liquide de Dubos âgée de 10 jours tout au plus et diluée à la concentration convenable, après que le poids des bacilles qu'elle contenait a été évalué par comparaison néphélographique avec une série de suspensions de BCG de concentrations connues. Si la souche est très pathogène, comme dans le cas présent, nous la réinoculons à des doses plus faibles, telles que 0,001 mg. Nous effectuons également, sans passage intermédiaire *in vitro*, des réinoculations de fragments d'organes de cobaye traités par la soude à 4 p. 100 pendant une heure à 37°, puis neutralisés par l'acide sulfurique à 15 p. 100. Toute population bacillaire inoculée est titrée le jour même sur milieu à l'isoniazide. A la mort du

(2) Les taux d'antibiotique évalués en µg/cm<sup>2</sup> dans la méthode de Coletsos, qui est une méthode d'imprégnation en surface, sont équivalents aux taux en µg/cm<sup>3</sup> donnés par les autres méthodes.

cobaye, les populations bacillaires contenues dans les viscères les plus atteints sont titrées à leur tour. Une étude anatomo-pathologique est effectuée dans les cas qui ont paru les plus intéressants.

L'importance du *pouvoir catalasique* des cultures est appréciée par une méthode dérivée de la technique simplifiée de Middlebrook [10 b] :

La population de *M. tuberculosis* examinée est ensemencée sur milieu de Loewenstein-Jensen incliné dans un tube à essais de 15 mm de diamètre intérieur. Lorsqu'au bout de quatre à six semaines, la culture obtenue forme une nappe rugueuse, on y ajoute à la température du laboratoire 2 cm<sup>3</sup> de la solution suivante :

Solution à 10 p. 100 de Tween 80 dans l'eau distillée....	5 gouttes
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 10 volumes (= 2,7 p. 100) .....	10 cm <sup>3</sup>

Le tube est maintenu dans la position verticale. Après dix minutes, on mesure la hauteur de la colonne de mousse apparue à la surface du liquide.

Une souche normalement virulente et isoniazido-sensible de *M. tuberculosis* forme dans ces conditions une colonne de mousse de 3 cm de haut, ou plus. Mais, dans le texte qui suit, nous ne parlerons de « faible pouvoir catalasique » que dans les cas où la colonne n'atteint même pas 1 cm de haut et de « pouvoir catalasique nul » que s'il n'y a aucune formation de mousse pendant les dix minutes de l'expérience.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

**SOUCHE DEM.** — A titre d'exemple, nous décrivons ici en détail les expériences effectuées avec les populations bacillaires provenant de l'expectoration du 24 juin 1953 du malade DEM. Ces populations constituent ce que nous avons appelé « la souche DEM. ».

Comme le montre le schéma (fig. 1), deux cobayes ont été inoculés avec 0,5 cm<sup>3</sup> d'*expectoration*. D'après le titrage effectué directement sur une autre portion du même crachat, la population bacillaire qui en provenait était totalement résistante (3) à 1 µg d'isoniazide.

Au bout de trois mois et demi, l'un des cobayes mourait avec une tuberculose viscérale (4) et, dans la *rate*, une population bacillaire totalement résistante à 1 µg d'isoniazide. L'autre, sacrifié trois jours plus tard, présentait également une tuberculose viscérale et, dans les lésions pulmonaires, une population résistante à 1 µg.

(3) La *résistance totale* est donnée par la concentration en isoniazide du dernier tube dans lequel le nombre de colonies atteint au moins 50 p. 100 du nombre de colonies du tube témoin sans isoniazide.

(4) Nous appelons *lésions viscérales* celles qui atteignent *rate*, poumon ou foie.

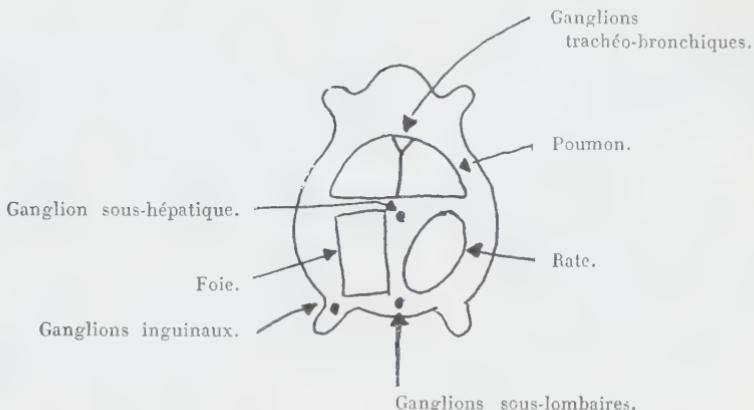


Schéma d'un cobaye (d'après Feldman).

- Lésions tuberculeuses massives.
- Lésions tuberculeuses d'importance moyenne.
- Granulations tuberculeuses disséminées.
- Granulations tuberculeuses isolées.
- Excavations.
- Lieu d'inoculation.
- $0,1 \text{ mg}$
- $\text{RT } 1\gamma$
- $\dagger 6 \text{ sem}$
- $\mathcal{S} 2 \text{ m.}$
- Culture sur milieu de Loeffler-Jensen sans isoniazide.
- Culture en milieu liquide de Dubos.
- Titrage d'isoniazido-résistance par la méthode de Coletsos, en tubes le Legroux imprégnés de la quantité d'isoniazide par centimètre carré indiquée sous le tube correspondant.

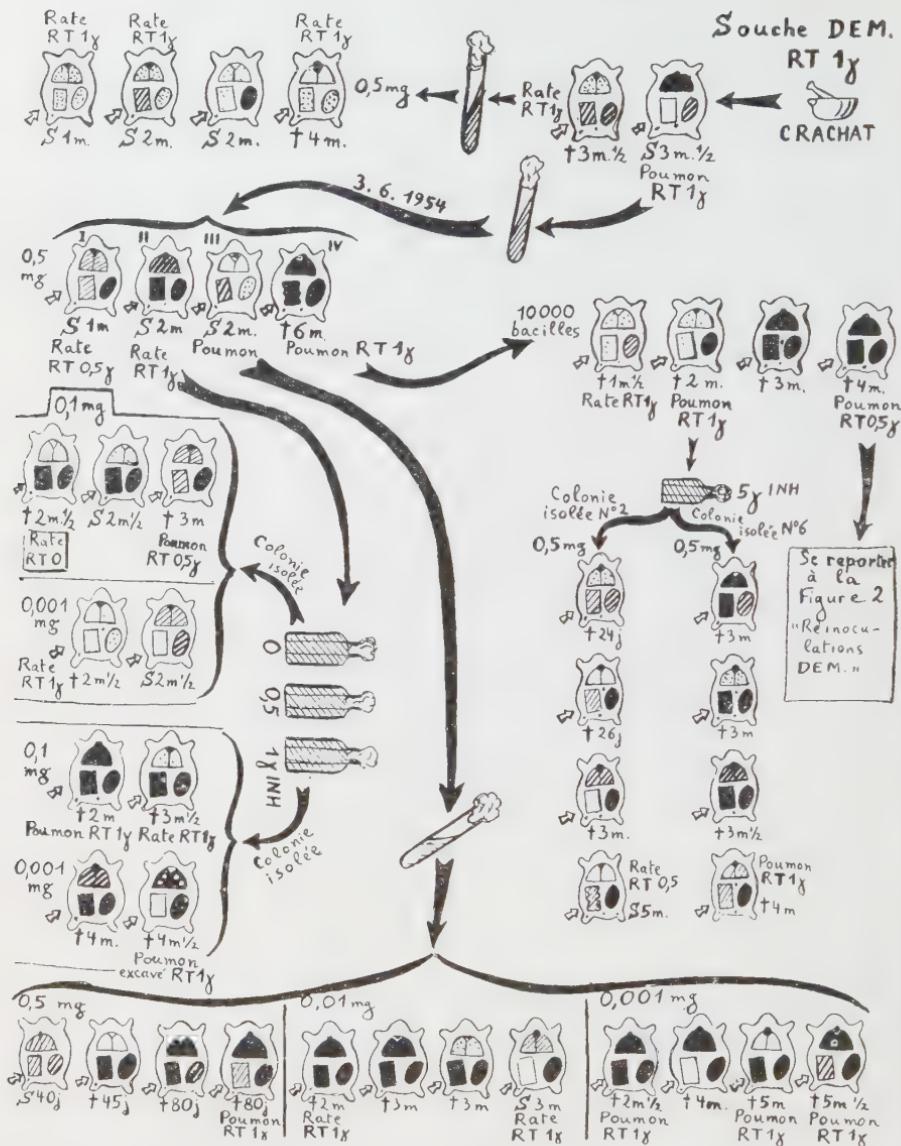


FIG. 1. — Schéma des principales expériences concernant la souche DEM. Pour ne pas surcharger ce schéma, nous n'avons pas représenté les repiquages en milieu de Dubos qui précèdent chaque inoculation (excepté les réinoculations directes de cobaye à cobaye). Nous n'avons pas représenté non plus ici l'expérience des repiquages successifs sur milieu de Löwenstein-Jensen, que nous avons poursuivie pendant trois ans à partir de la culture initiale de l'expectoration et qui est décrite dans le texte.

Sur la culture en milieu de Loewenstein-Jensen de la *rate du premier cobaye*, on a prélevé un mélange de colonies, que l'on a repiqué d'abord en milieu de Loewenstein-Jensen, puis, à deux reprises, en milieu de Dubos, pour inoculer finalement 0,5 mg de bacilles à quatre cobayes. Ceux-ci, sacrifiés ou morts spontanément en un à quatre mois, présentaient tous des lésions viscérales à l'autopsie. Les lésions spléniques de trois d'entre eux contenaient des populations bacillaires résistantes à 1 µg d'isoniazide et pouvant de façon assez irrégulière sur milieu de Loewenstein-Jensen.

Sur la culture du *poumon du second cobaye* inoculé directement avec le crachat, on a prélevé un autre mélange de colonies et, le 3 juin 1954, on a inoculé de la même façon 0,5 mg de bacilles à quatre autres cobayes (n°s I, II, III et IV de la fig. 1). Ceux-ci, sacrifiés ou morts spontanément, ont tous présenté des lésions viscérales contenant des populations bacillaires isoniazido-résistantes :

**COBAYE N° I, INOCULÉ LE 3 JUIN 1954.** — Il a été sacrifié après un mois. Les lésions pulmonaires (titrage n° 1 du tableau I) et les lésions spléniques contenaient des populations bacillaires totalement résistantes à 0,5 µg d'isoniazide et presque totalement à 1 µg.

La mort des trois autres cobayes a été l'occasion de passages de types variés :

TABLEAU I — Exemples de titrages d'isoniazido-résistance par la méthode de Coletsos.

Taux d'isoniazide en µg/cm <sup>2</sup>	0	0,1	0,2	0,5	1	5	10
Titrage N° 1	107 79	69	100	100	64	1	0
2	300 11	80	10	144	149	0	0
3	131 125	102	116	94	89	—	—
4	422 120	20	7	1	0	0	0
5	167 104	70	—	110	200	0	0
6	201 312	214	224	196	283	4	0
7	58 56	45	40	63	40	0	0
8	102 114	81	—	34	16	0	0

Les chiffres indiqués représentent le nombre de colonies par tube. Il y a deux tubes témoins sans isoniazide pour chaque titrage.

COBAYE N° II, INOCULÉ LE 3 JUIN 1954. — Sacrifié au bout de deux mois, il présentait une tuberculose généralisée. Le titrage des bacilles contenus dans les lésions spléniques a donné des résultats fort irréguliers (titrage n° 2).

Des colonies isolées ont été prélevées dans le tube témoin et le tube contenant 1 µg d'isoniazide par centimètre carré.

A. *Tube témoin.* — La descendance de cette colonie, repiquée à deux reprises en milieu de Dubos, présente une isoniazido-résistance totale à 1 µg (titrage n° 3) et son pouvoir catalasique est presque nul. On a inoculé trois cobayes avec 0,1 mg et deux cobayes avec 0,001 mg de bacilles provenant de cette colonie :

a) 0,1 mg. — Les trois cobayes sont morts en deux mois et demi à trois mois avec une tuberculose viscérale considérable.

Le titrage des lésions spléniques de l'un des cobayes morts en deux mois et demi a donné le résultat que montre le titrage n° 4 du tableau I. Il s'agissait donc apparemment d'une population sensible à l'isoniazide presque dans son entier. Son pouvoir catalasique n'a malheureusement pas été déterminé et les bacilles n'ont plus poussé lors d'une tentative ultérieure de repiquage, ce qui nous a empêché d'effectuer un titrage de contrôle.

En revanche, la population bacillaire contenue dans le poumon, bourré de granulations grises, du cobaye mort au bout de trois mois, présentait une résistance totale à 0,5 µg d'isoniazide et une résistance partielle à 1 µg, avec un pouvoir catalasique très faible.

b) 0,001 mg. — Les deux cobayes sont morts avec des lésions viscérales, plutôt discrètes chez l'un, d'importance moyenne chez l'autre. La culture de la rate du cobaye le moins atteint a révélé une population totalement résistante à 1 µg d'isoniazide.

B. *Tube 1 µg INH.* — Cette colonie isolée a été elle aussi repiquée à deux reprises en milieu de Dubos, puis 1/10 de milligramme de bacilles a été inoculé à deux cobayes et 1/1000 de milligramme à deux autres :

a) 0,1 mg. — Les deux cobayes sont morts avec des lésions viscérales considérables. Les lésions pulmonaires de l'un (titrage n° 5) et les lésions spléniques de l'autre (titrage n° 6) contenaient des populations bacillaires totalement résistantes à 1 µg d'isoniazide.

b) 0,001 mg. — Les deux cobayes sont morts avec des lésions viscérales importantes. Le dernier présentait un poumon bourré de nodules qui contenaient une population bacillaire totalement résistante à 0,5 µg d'isoniazide et presque totalement à 1 µg et de pouvoir catalasique pratiquement nul.

COBAYE N° III, INOCULÉ LE 3 JUIN 1954. — La population bacillaire contenue dans les lésions pulmonaires de ce cobaye présentait une résistance totale à 1 µg d'isoniazide et un pouvoir catalasique très faible. Elle a été inoculée à trois séries de quatre cobayes, aux doses de 0,5 mg, 0,01 mg et 0,001 mg respectivement :

a) 0,5 mg. — Ils présentent tous des lésions viscérales importantes. Le poumon du dernier contient une population bacillaire totalement résistante à 1 µg d'isoniazide.

b) 0,01 mg. — Ils présentent tous une tuberculose généralisée. Les lésions spléniques et pulmonaires du premier contiennent des populations bacillaires résistantes à 1 µg d'isoniazide, ainsi que les lésions spléniques du quatrième.

c) 0,001 mg. — Ils meurent tous avec des lésions viscérales considérables. Les lésions pulmonaires du premier et du troisième (titrage n° 7) contiennent des populations bacillaires totalement résistantes à 1 µg d'isoniazide. La rate, dont le volume est dix fois supérieur à la normale, et le poumon, infiltré de lésions tuberculeuses, du quatrième cobaye, contiennent des populations bacillaires totalement résistantes à 0,5 µg d'isoniazide, presque totalement à 1 µg et de pouvoir catalasique nul.

**COBAYE N° IV, INOCULÉ LE 3 JUIN 1954.** — Ce cobaye est mort au bout de six mois avec une tuberculose généralisée massive. Un fragment de poumon, contenant une population bacillaire totalement résistante à 1 µg d'isoniazide, a été réinoculé, sans passage intermédiaire *in vitro*, à quatre nouveaux cobayes. Ceux-ci ont reçu 10 000 à 20 000 bacilles viables chacun, à en juger par la culture du fragment réinoculé. Ils sont tous morts avec des lésions viscérales :

a) *Premier cobaye.* — Mort en six semaines, il présentait déjà des granulations tuberculeuses sur tous les viscères. Ses lésions spléniques contenaient une population totalement résistante à 1 µg d'isoniazide et de faible pouvoir catalasique. D'autres recherches de catalase effectuées sur les cultures provenant de 20 colonies différentes, prélevées sur le tube témoin du titrage, ont confirmé ce faible pouvoir catalasique pour chacune d'entre elles.

b) *Deuxième cobaye.* — Il est mort en deux mois. Ses lésions pulmonaires pullulaient de bacilles, dont le titrage a montré la résistance totale à 1 µg. Dans le tube contenant 5 µg d'isoniazide par centimètre carré, on trouvait encore 7 colonies, apparues un ou deux mois après l'ensemencement et toutes de faible pouvoir catalasique. Deux de ces colonies, les n°s 2 et 6, ont été retitrées et inoculées, à la dose de 0,5 mg, à quatre cobayes chacune, après trois repiquages en milieu de Dubos :

1<sup>o</sup> *Colonie n° 2.* — Sa descendance présente une résistance totale à 0,5 µg d'isoniazide et partielle à 1 µg, bien que prélevée dans le tube correspondant à 5 µg. Trois cobayes meurent en vingt-quatre à quarante-vingt-dix jours avec des lésions viscérales. Le quatrième, sacrifié au bout de six mois, présente une rate de volume six fois supérieur à la normale, qui contient une population totalement résistante à 0,5 µg ; le foie est fibreux.

2<sup>o</sup> *Colonie n° 6.* — La faiblesse apparente de l'isoniazido-résistance de sa descendance (titrage n° 8 du tableau I) est encore plus inattendue. Mais son pouvoir catalasique reste très faible. Les quatre cobayes meurent avec des lésions viscérales importantes. Le poumon du dernier contient une population bacillaire totalement résistante à 1 µg d'isoniazide et de faible pouvoir catalasique. (Mais là non plus, aucune colonie n'apparaît sur le tube contenant 5 µg d'isoniazide par centimètre carré.)

c) *Troisième cobaye.* — Il meurt en trois mois avec une tuberculose généralisée massive.

d) *Quatrième cobaye.* — Il meurt en quatre mois, lui aussi avec une tuberculose généralisée massive et une rate énorme.

A son tour, un fragment d'un de ses poumons, contenant une population totalement résistante à 1 µg d'isoniazide, est réinoculé directement à quatre nouveaux cobayes.

C'est le début d'une série de *passages directs sur l'animal*, continués toujours suivant le même principe (fig. 2) : à la mort du dernier

### RÉINOCULATIONS DEM.

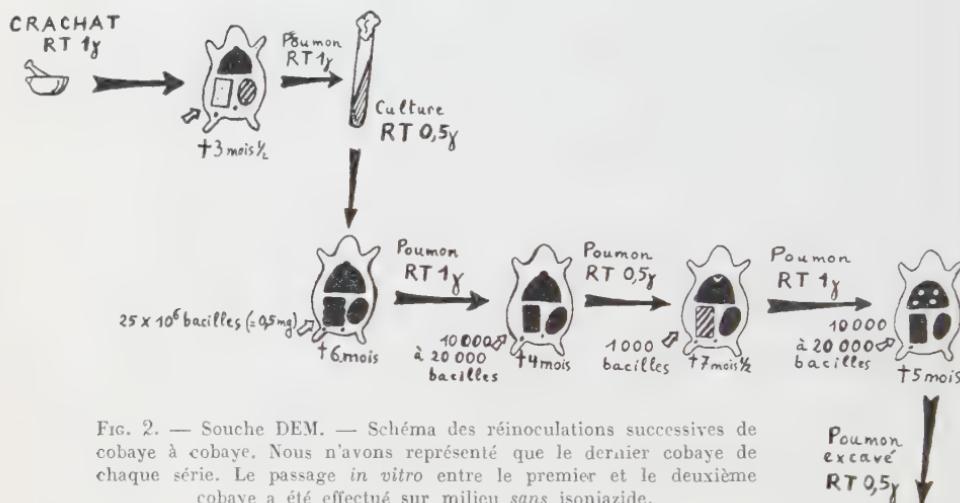


FIG. 2. — Souche DEM. — Schéma des réinoculations successives de cobaye à cobaye. Nous n'avons représenté que le dernier cobaye de chaque série. Le passage *in vitro* entre le premier et le deuxième cobaye a été effectué sur milieu sans isoniazide.

cobaye de chaque série, on contrôle l'importance des lésions et l'isoniazido-résistance des bacilles contenus dans le poumon, dont on réinocule un fragment traité par la soude à une nouvelle série de quatre cobayes, sans passage intermédiaire *in vitro*.

A l'heure actuelle (novembre 1957), la souche a subi ainsi 8 passages sur cobaye, gardant à peu de chose près sa résistance et sa virulence, sans augmentation de son pouvoir catalasique. A partir du cinquième passage, on a constaté trois fois l'existence de lésions excavées (fig. 7). Un neuvième passage est en cours.

D'autre part, un mélange de colonies prélevé sur la culture directe du crachat a été repiqué régulièrement *in vitro* toutes les six à huit semaines pendant trois ans, sur milieu de Loewenstein-Jensen, sans perte de son isoniazido-résistance ni augmentation de son pouvoir catalasique, puis il a été réinoculé, après repiquage en milieu liquide de Dubos, à quatre cobayes à la dose de 0,001 mg et à trois autres à la dose de  $10^{-6}$  mg. Cette expérience est en cours. Pendant les sept

mois écoulés depuis l'inoculation, trois des cobayes inoculés avec 0,001 mg et l'un des cobayes inoculés avec  $10^{-6}$  mg sont morts avec des lésions viscérales ; les viscères titrés contiennent des populations totalement résistantes à 1 µg d'isoniazide.

**AUTRES SOUCHES : TIL. II, GO. ET BR. 1.** — Ces souches ont été étudiées suivant les mêmes procédés. Nous n'avons pas la place ici de décrire ces expériences d'une façon aussi détaillée que les précédentes. Mais il suffira au lecteur de se reporter aux schémas correspondants (fig. 3, 5 et 6) pour reconstituer la marche que nous avons suivie, à la lumière de la description de la souche DEM.

#### RÉSULTATS D'ENSEMBLE.

**SOUCHE DEM.** — Comme l'indiquent les schémas (fig. 1 et 2) et la « Partie expérimentale » qui précède, nous avons déjà effectué 63 inoculations au cobaye et 67 titrages d'isoniazido-résistance. Nous avons ainsi étudié pendant quatre ans l'expectoration initiale (*totale résistante à 1 µg d'isoniazide et à 1 µg de streptomycine*) et toutes les populations bacillaires qui en provenaient dans les conditions suivantes :

- Soit après repiquage sur milieu solide de Loewenstein-Jensen *sans isoniazide* ;
- Soit après repiquage sur ce même milieu *imprégné d'isoniazide*, à des taux de 1 µg ou de 5 µg/cm<sup>2</sup> ;
- Soit dans les viscères du *cobaye*, après des passages répétés sur cet animal ;
- Soit après une succession de repiquages *in vitro* et de passages sur le cobaye alternés.

Ces diverses populations ont toujours présenté :

1° Un fort *pouvoir pathogène* pour le cobaye. Tous les cobayes inoculés avec des doses allant de 1 000 bacilles à 50 millions de bacilles présentaient des lésions viscérales, le plus souvent très importantes. Aucun de ceux dont on a laissé la maladie évoluer jusqu'au bout n'a guéri.

2° Un *pouvoir catalasique* faible ou nul.

3° Une *isoniazido-résistance* totale à 0,5 µg et totale ou presque totale à 1 µg. Nous n'avons observé que deux exceptions :

- Dans un de ces deux cas, on a retrouvé une population presque entièrement sensible dans la rate d'un cobaye mort avec des lésions considérables. Le pouvoir catalasique de cette population est resté inconnu et il n'a pas pu y avoir de titrage de contrôle.
- Dans l'autre cas, il s'agissait de la population provenant d'une colonie isolée prélevée sur un tube contenant 5 µg d'isoniazide par centimètre carré : son titrage a montré une sensibilité partielle à 0,5 et 1 µg d'isoniazide.

Mais le pouvoir catalasique était resté très faible. Et quand on l'a inoculée au cobaye, on a retrouvé une population totalement résistante à 1 µg dans les lésions pulmonaires de l'animal.

4° Au bout de 8 passages successifs de cobaye à cobaye (fig. 2), s'étendant sur quatre ans, on retrouve encore des populations bacillaires totalement résistantes à 0,5 µg d'isoniazide et partiellement à 1 µg, et fortement pathogènes pour le cobaye. Lors des cinquième, sixième et septième passages on a observé des lésions excavées. Le neuvième passage est en cours.

5° Au bout de trois ans de repiquages réguliers *in vitro*, sur milieu de Loewenstein-Jensen, de la population initiale, on a retrouvé une population qui n'avait rien perdu de son isoniazido-résistance du début et dont le pouvoir catalasique était resté faible. L'étude de son pouvoir pathogène pour le cobaye est en cours : il paraît d'ores et déjà important.

**SOUCHE TIL. II.** — La souche TIL. II est à l'étude depuis deux ans et demi. Les populations qui en dérivent ont subi 58 inoculations au cobaye et près de 60 titrages d'isoniazido-résistance, dans l'ordre schématisé par la figure 3. Cette étude de l'isoniazido-résistance, du pouvoir pathogène et du pouvoir catalasique, a porté sur :

a) L'expectoration elle-même, totalement résistante à 1 µg d'isoniazide et sensible à 1 µg de streptomycine.

b) Des populations ensemencées sur milieu de Loewenstein-Jensen *sans* isoniazide, qui subissent ensuite jusqu'à 3 passages successifs sur cobaye.

c) Des populations qui subissent successivement : 1° une culture sur milieu de Loewenstein-Jensen imprégné avec 1 µg d'isoniazide *par centimètre carré* ; 2° un passage sur cobaye ; 3° une culture soit sur milieu de Loewenstein-Jensen *sans* isoniazide, soit sur milieu imprégné avec 5 ou 10 µg d'isoniazide *par centimètre carré* : 4° une nouvelle inoculation au cobaye.

d) Des populations inoculées au cobaye après un seul passage sur milieu de Loewenstein-Jensen imprégné avec 5 µg d'isoniazide.

Toutes ces populations ont toujours présenté, à tous les stades de l'expérimentation :

1° Une isoniazido-résistance totale à 0,5 µg/cm<sup>2</sup>, presque totale ou totale à 1 µg, et partielle ou totale à 5 µg.

2° Un pouvoir catalasique faible ou nul.

3° Qu'elles aient été inoculées à la dose de 0,5 mg ou de 0,001 mg et même si elles ont été cultivées *au préalable* sur 1 µg, 5 µg ou 10 µg d'isoniazide *par centimètre carré*, toutes les populations étudiées ont provoqué la mort du cobaye avec des lésions

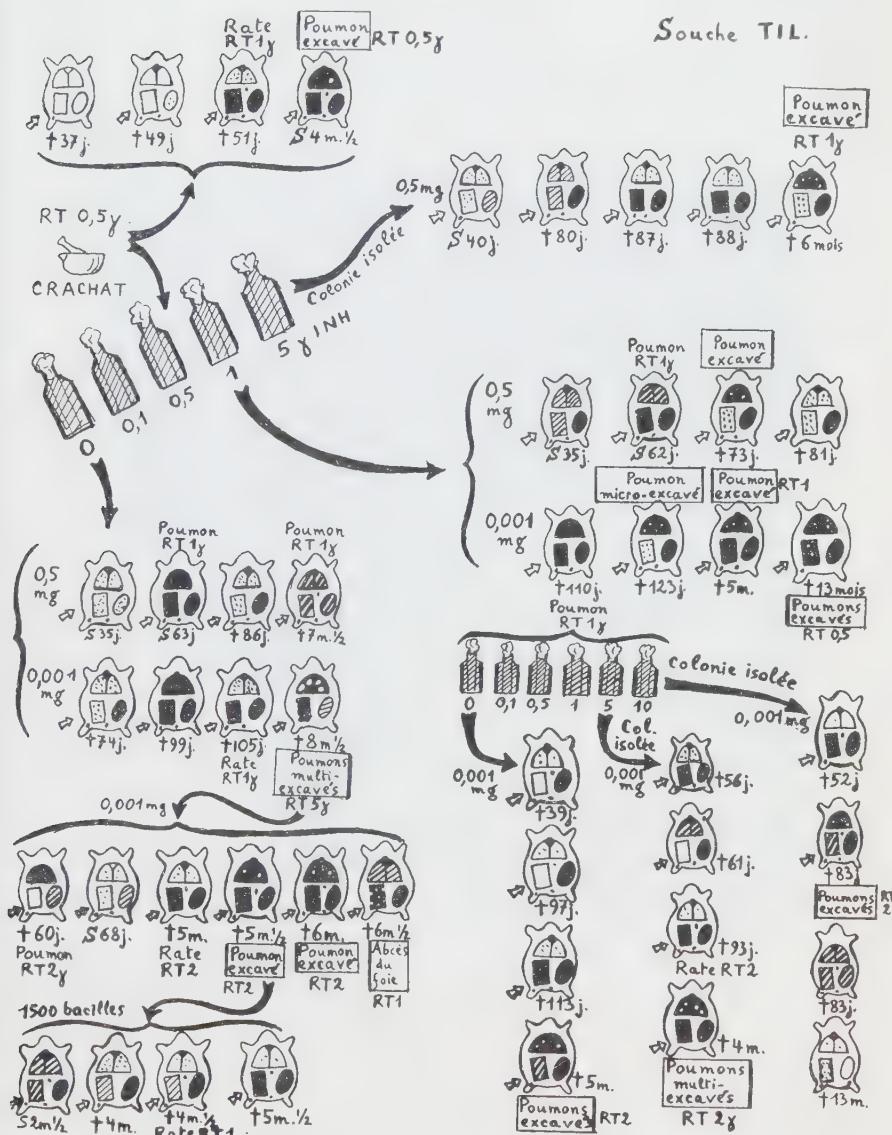


FIG. 3. — Schéma des expériences concernant la souche TIL. II.  
L'expérience des inoculations à faible dose n'a pas été représentée.

généralisées, à plus ou moins longue échéance (jusqu'à treize mois dans un cas).

Seul, un des quatre cobayes inoculés avec 0,001 mg de bacilles prélevés dans un tube contenant 10 µg d'isoniazide par centimètre carré, mort d'une infection intercurrente après treize mois, ne présentait comme lésions viscérales macroscopiques qu'un « foie



FIG. 4. — Souche TIL. II. — Poumons polyexcavés du cobaye inoculé avec 0,001 mg de culture provenant du tube témoin du titrage direct du crachat et mort au bout de huit mois et demi.

ficelé » piqueté de granulations grises. La culture d'un fragment de poumon de ce cobaye a donné une dizaine de colonies de bacilles tuberculeux. Ces lésions paraissaient curables ou pour le moins stabilisées.

Dans les poumons de 14 cobayes, c'est-à-dire chez près d'un cobaye sur quatre, on a constaté (fig. 3 et 4), au sein d'une tuberculose généralisée, l'existence de *lésions nécrotiques enkystées*,

dont une partie au moins présente les mêmes caractères histologiques que les *cavernes chroniques de l'homme*. Les 10 excavations dont nous avons titré la population bacillaire contiennent des bacilles aussi résistants qu'avant l'inoculation.

4° Une expérience d'inoculation à *faible dose* de la population provenant du poumon excavé d'un cobaye inoculé avec 0,001 mg de bacilles (prélevés sur milieu de culture *sans* isoniazide) a encore montré, aux doses les plus faibles que nous avons utilisées :  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  mg de bacilles, des *lésions viscérales nettes* contenant des populations bacillaires aussi isoniazido-résistantes qu'à l'inoculation.

**SOUCHE GO.** — Cette souche a été étudiée pendant trois ans et demi. La population initiale, provenant directement de l'expectoration, était totalement résistante à 0,5 µg d'isoniazide et à 1 µg de streptomycine. Les populations qui en dérivent ont subi 40 titrages d'isoniazido-résistance et 41 inoculations. Cette étude concerne, comme le montre la figure 5 :

a) Les populations inoculées au cobaye après un passage unique ou répété sur milieu de Loewenstein-Jensen *sans* isoniazide, puis en milieu de Dubos.

b) Les populations provenant de la rate de deux des cobayes (n°s 3 et 4) ainsi inoculés. Ces deux populations, cultivées une première fois sur milieu de Loewenstein-Jensen, ont été ensuite repiquées en milieu de Dubos et titrées. De nouvelles populations ont été prélevées, les unes dans les tubes témoins *sans* isoniazide de ces titrages, les autres dans les tubes *imprégnés avec 0,5 µg d'isoniazide par centimètre carré*; puis elles ont toutes été réinoculées au cobaye après un plus ou moins grand nombre de repiquages *in vitro*.

Nous avons constaté que :

1° Les cobayes inoculés *au début*, avec 0,5 mg ou 0,01 mg, présentaient tous des *lésions viscérales*, très importantes dans 6 cas sur 12. Dans 2 de ces 6 cas, on a observé des excavations.

2° Les populations provenant des rates de deux de ces premiers cobayes (les n°s 3 et 4) morts, l'un en six et l'autre en dix semaines avec des lésions viscérales considérables, présentaient un pouvoir pathogène beaucoup moins accentué et très irrégulier d'un cobaye à l'autre, comme s'il s'était produit un effondrement partiel de la virulence de la souche.

Certains animaux inoculés avec 0,5 mg sont morts d'infection intercurrente au bout de plusieurs mois et on n'a trouvé chez eux aucune lésion tuberculeuse viscérale. Un autre, sacrifié au bout de vingt-cinq mois, présentait comme unique lésion une adénopathie locale, dont la culture a donné une seule colonie de bacilles tuberculeux. Quelques

## Souche GO.

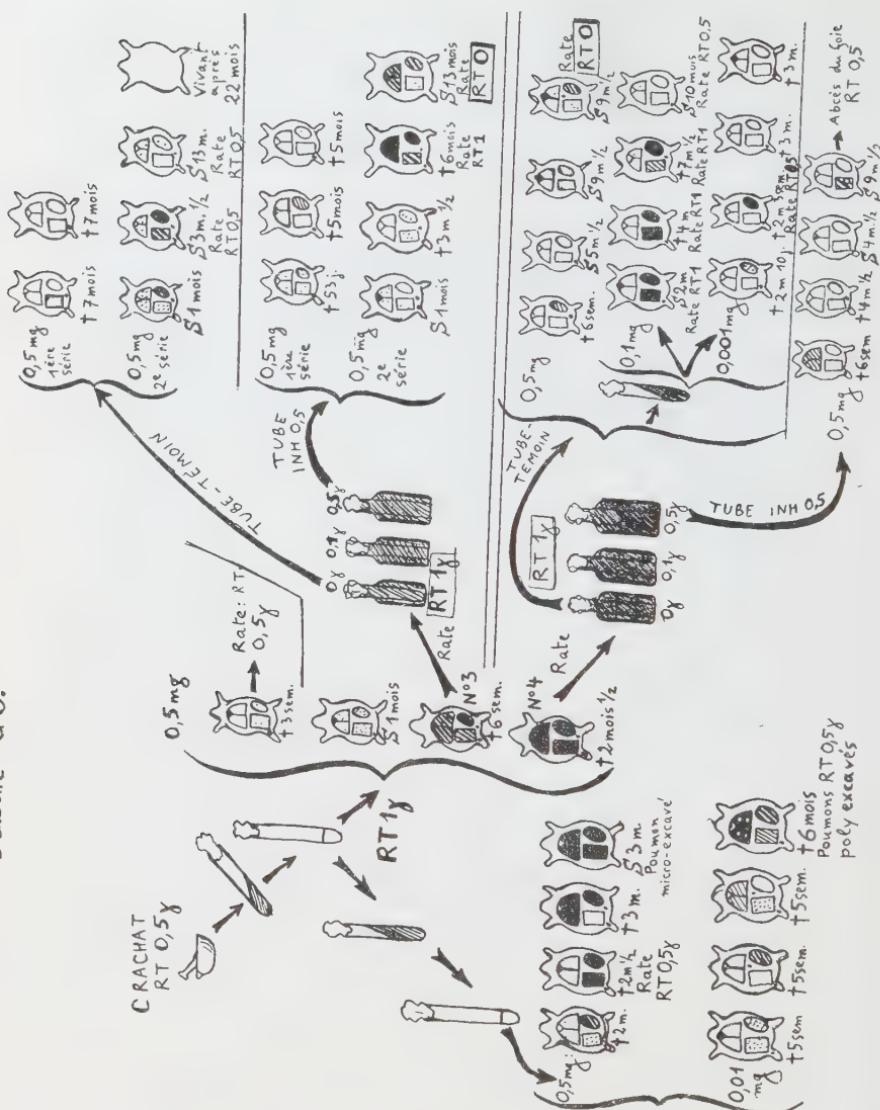


FIG. 5. — Schéma des expériences concernant la souche GO. Les repiquages en milieu de Löwenstein-Jensen et en milieu de Dubos qui ont précédé les titrages, et en particulier le titrage des rates des cobayes nos 3 et 4, n'ont pas été représentés. Il en est de même pour les repiquages qui ont précédé chaque fois la « 2<sup>e</sup> série » d'inoculations.

autres cobayes présentaient en revanche des lésions viscérales assez considérables même lorsqu'ils étaient inoculés avec 0,1 mg et, dans un cas, avec 0,001 mg. Chez un cobaye on a observé un important abcès bacillifère du foie.

Il s'agit donc de lésions très variées, s'échelonnant entre l'absence totale de lésions viscérales et la tuberculose viscérale importante. La présence ou l'absence, avant cette réinoculation, d'un passage sur milieu imprégné avec 0,5 µg d'isoniazide par centimètre carré ne semble avoir eu *aucune influence* sur le comportement de ces populations.

3° Sauf dans deux cas, toutes les populations titrées, aussi bien lors des divers repiquages *in vitro* que dans les viscères des cobayes que nous venons de décrire, présentaient une *isoniazido-résistance* totale à 0,5 µg et partielle ou totale à 1 µg et un *pouvoir catalasique* faible ou nul.

Les deux exceptions concernent les viscères de deux cobayes dans lesquels on a trouvé des populations *isoniazido-sensibles* et de *pouvoir catalasique voisin de la normale*:

1° Dans le premier cas, il s'agissait d'un cobaye inoculé avec la population provenant du cobaye n° 3 après passage sur milieu à *l'isoniazide*, sacrifié au bout de treize mois.

2° Dans l'autre, d'un cobaye inoculé avec la population provenant du cobaye n° 4, après passage sur milieu *sans isoniazide*, sacrifié au bout de neuf mois et demi.

Tous les deux présentaient des lésions viscérales plutôt discrètes et d'énormes ganglions trachéo-bronchiques lardacés.

**SOUCHE BR. 1.** — Elle provient d'une culture sur milieu de Loewenstein-Jensen, prélevée sur un malade qui est mort de sa tuberculose par la suite. Elle présentait à l'origine une résistance totale à 1 µg d'isoniazide, à 20 µg de streptomycine et à 0,1 µg de PAS.

En deux ans nous avons étudié, comme le montre la figure 6 :

a) Les populations obtenues en inoculant la culture initiale, après repiquage en milieu de Dubos, à deux cobayes.

b) La population obtenue en réinoculant un ganglion sous-lombaire du *premier* cobaye à deux autres.

c) Les populations obtenues en réinoculant, après passage *in vitro*, une colonie provenant des lésions pulmonaires du *deuxième* cobaye, à une nouvelle série de 8 cobayes. La population contenue dans le poumon d'un des animaux de cette série est cultivée sur milieu imprégné avec 0,2 µg d'isoniazide par centimètre carré et une colonie isolée prélevée sur ce milieu est réinoculée, après deux repiquages en milieu de Dubos, à 4 autres cobayes.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° La dose d'inoculation n'a jamais dépassé 0,01 mg, elle s'est

même parfois bornée à quelques dizaines de bacilles. Mais nous avons toujours observé, même dans les cas où la population provenait d'un milieu imprégné avec 0,2 µg d'isoniazide par centimètre carré, la constitution d'une tuberculose généralisée progressive. Aucun des 16 cobayes n'a survécu plus de seize semaines.

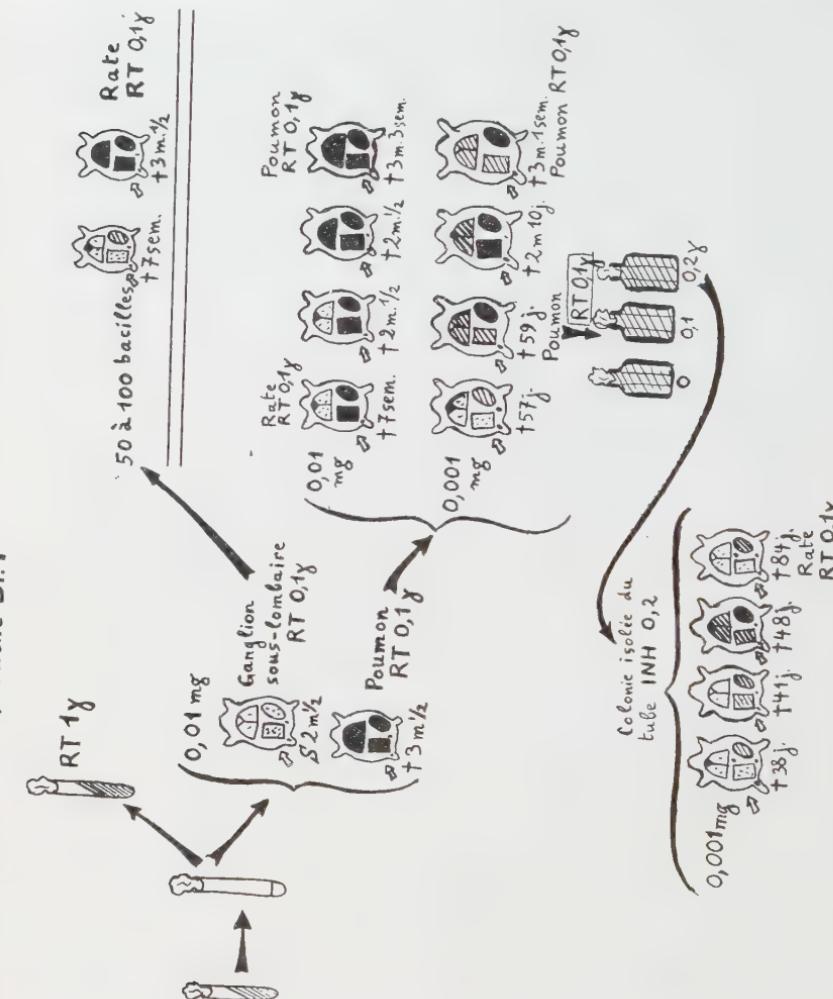


FIG. 6. — Schéma des expériences concernant la souche BR. I.

sique normal. Aucune de ces populations ne s'est montrée totalement résistante à plus de 0,2 µg d'isoniazide. Et même, à deux reprises, les populations titrées au moment de l'inoculation d'une série de cobayes contenaient autant de bacilles sensibles que de bacilles résistants à 0,1 µg d'isoniazide. Cependant, dans les viscères des cobayes ainsi inoculés nous avons retrouvé des populations totalement résistantes à 0,1 µg d'isoniazide.

3° Cette souche faiblement isoniazido-résistante et de pouvoir catalasique normal paraît donc beaucoup plus proche des souches isoniazido-sensibles ordinaires que des souches isoniazido-résistantes fortement pathogènes décrites ci-dessus. Nous maintenons cependant cette souche parmi les isoniazido-résistantes, car nous avons eu l'occasion de constater que même une isoniazido-résistance à 0,1 µg pouvait avoir une importance clinique.

#### CONCLUSIONS.

En résumé, l'étude de quatre souches isoniazido-résistantes et fortement pathogènes pour le cobaye, poursuivie pendant deux à quatre années, nous a permis de mettre en évidence des caractères particuliers à chacune de ces souches (tableau II) :

TABLEAU II. — Tableau des résultats d'ensemble.

Nom de la souche	Isoniazido-résistance totale	Pouvoir pathogène (cobaye)	Pouvoir catalasique
DEM.	0,5-1 µg	Considérable	Faible
TIL. II	0,5-5 µg	Considérable	Faible
GO.	0,5-1 µg	Irrégulier	Faible
BR. 1	0,1 µg	Considérable	Normal

1° La souche BR. 1 très pathogène, faiblement isoniazido-résistante et de pouvoir catalasique normal, nous a paru très proche des souches isoniazido-sensibles ordinaires.

2° La souche GO. modérément isoniazido-résistante et de faible pouvoir catalasique, fortement pathogène à l'origine, s'est modifiée à la suite de repiquages, ne manifestant plus qu'un pouvoir pathogène assez faible et surtout irrégulier.

3° La souche DEM., modérément résistante et de faible pouvoir catalasique, a toujours conservé un pouvoir pathogène considérable, même après de nombreuses réinoculations ou de nombreux repiquages.

4° La souche TIL. II est analogue à la précédente, mais avec

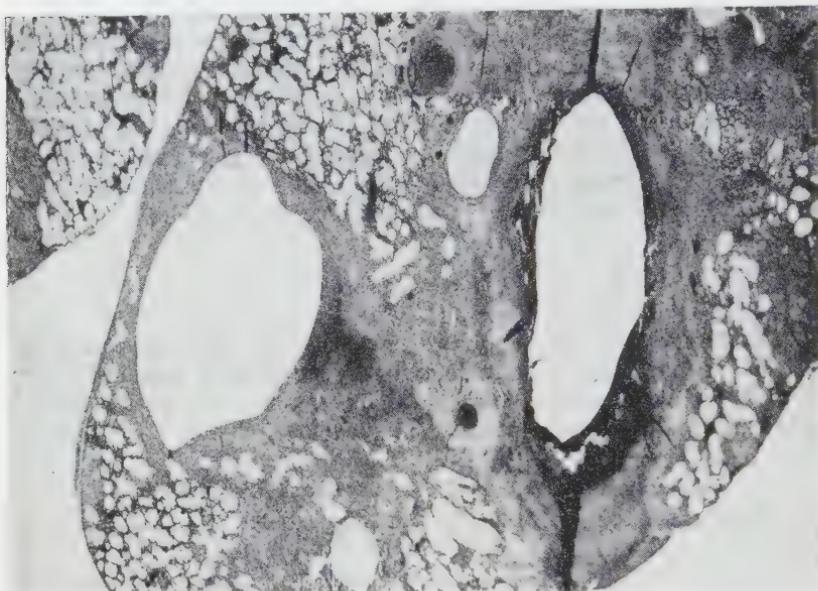


FIG. 7. — Sixième passage direct sur cobaye de la souche DEM. Aspect au faible grossissement des excavations pulmonaires observées cinq mois et demi après l'inoculation d'un fragment de poumon de cobaye lui-même excavé.

la particularité de réaliser des lésions excavées chez un cobaye sur quatre.

La discussion de ces résultats fera l'objet d'un second mémoire.

#### SUMMARY

STUDY OF SOME ISONIAZID-RESISTANT STRAINS  
OF *Mycobacterium tuberculosis*, HIGHLY PATHOGENIC FOR GUINEA-PIGS.  
I. — PROPERTIES OF THE DIFFERENT STRAINS.

75 % of isoniazid-resistant strains are weakly pathogenic for guinea-pigs. 25 % remain highly pathogenic. In some of these, pathogenicity results from the presence in the bacillary population of a minority of sensitive bacilli ; however, there are cases (we

observed 18 of them) in which isoniazid-resistant bacilli themselves are the pathogenic ones.

We studied during two to four years the behaviour of some of the latter strains :

1° Strain BR. I, a highly pathogenic, weakly isoniazid-resistant strain, strongly catalase-positive, seems closer to usual sensitive strains than to other isoniazid-resistant strains. Nevertheless, even such a weak isoniazid-resistance may show an incidence on the clinical condition of the patient.

2° Strain GO., fairly isoniazid-resistant, weakly catalase-positive, was highly pathogenic at first. However, in two cases, when subcultured from the spleen of a guinea-pig, it lost its stability and much of its pathogenicity.

3° Strain DEM., fairly isoniazid-resistant, weakly catalase-positive, has always shown a high pathogenicity, in spite of a long succession of passages *in vitro* or *in vivo*.

4° Strain TIL. II behaves in the same way, but every fourth guinea-pig shows cavitation.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARNETT (M.), BUSHBY (S. R. M.) et MITCHISON (D. A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 568-581 ; *Lancet*, 1953, **1**, 314.
- [2] BERNARD (E.), KREIS (B.) et LE JOUBIOUX (E.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1113-1144.
- [3] COLETSOS (P.-J.). *Presse méd.*, 1951, **59**, 1772-1774.
- [4] FREERKSEN (E.) et MEISSNER (G.). *Bull. UICT*, 1956, **26**, 248-267.
- [5] GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.), VOISIN (C.) et FABRE (M.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1-25.
- [6] JENSEN (K. A.). 2<sup>e</sup> rapport de la Sous-Commission des Méthodes de Laboratoire, *Bull. UICT*, 1955, **25**, 96-111.
- [7] LIBERMANN (C.). *Thèse Médecine*, Paris, 1953.
- [8] LIBERMANN (C.), RIST (N.) et LEVADITI (J. C.). *Libro de Actas de la XIIIa Conferencia Internacional de la Tuberculosis*, Madrid, 1954, p. 411.
- [9] MEISSNER (G.). *Fortschr. Tub.*, 1956, **7**, 52-100.
- [10 a] MIDDLEBROOK (G.) et COHN (M. L.). *Science*, 1953, **118**, 297-299.
- [10 b] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471-472.
- [11] MITCHISON (D. A.). *Brit med. J.*, 1954, **1**, 128.
- [12] NITTI (V.) et TANZI (P. L.). *XI<sup>e</sup> Congrès Ital. Phtisiol.*, Turin, 1953.
- [13] RIST (N.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 75-89.
- [14] RIST (N.), LIBERMANN (C.), GRUMBACH (F.) et LEVADITI (J. C.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 659-679.
- [15] STEENKEN (W., Jr.) et WOLINSKY (E.). *Am. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 548-556.
- [16] TUCZEK (H.) et SAUPE (M.). *Münch. med. Wschr.*, 1952, **94**, 1307-1314.

## **LES BACTÉRIES DE LA FLORE FÉCALE DE LA VACHE SAINTE**

par A. WILSSENS et R. BUTTIAUX (\*).

(*Institut Agronomique de l'Etat à Gand [Belgique]  
et Institut Pasteur de Lille*)

L'un des buts de la bactériologie alimentaire est la fixation de normes microbiennes quantitatives et qualitatives tolérables pour les diverses substances alimentaires. Leur définition se heurte à de nombreuses et sérieuses difficultés mises en évidence par Dack [1] et Thatcher [2]. L'un des soucis majeurs de l'hygiéniste est la recherche des souillures fécales et de nombreuses discussions s'élèvent au sujet de la bactérie qu'il convient de choisir comme test valable d'une contamination de cette nature. Il semble indispensable, pour conclure, d'étudier, au préalable, les constituants habituels des flores intestinales des différentes espèces animales dont les viandes, abats ou sécrétions sont utilisés par l'homme pour sa nourriture. L'expérience montre, en effet, qu'il existe des différences appréciables entre les bactéries trouvées dans le tractus digestif de l'homme et celles rencontrées dans celui des animaux. Bien plus, chacun d'eux peut héberger un germe spécifique ou presque caractéristique de son espèce. Ainsi, Barnes et Ingram [3] considèrent *Strep. faecium* comme un hôte significatif de l'intestin du porc.

Ce mode de déduction est particulièrement applicable au lait, car il est soumis à des contaminations de multiples origines ; pour apprécier leur nature et leurs modalités, il paraît indispensable d'établir un bilan au moins qualitatif de la flore intestinale des vaches saines. C'est le but de ce travail pour les deux périodes de leur vie : l'hivernage à l'étable et le séjour au pâturage du printemps à l'automne. Cette question, à notre connaissance, n'a pas été l'objet d'une étude générale. Celle de Ankersmit [4] est trop ancienne pour être utilisable, étant donné les progrès de la bactériologie moderne. Vogeler [5] s'est occupé seulement des bactéries aérobies sporulées et Baumann [6] des germes présentant un intérêt pour l'industrie laitière. Plus récem-

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 octobre 1957.

ment, Märzendorfer [7], puis Haenel et Müller-Beuthow [8] ont comparé les flores fécales humaines et bovines, mais ont limité leurs recherches à quelques groupes de microorganismes.

#### ANIMAUX ÉTUDIÉS.

1<sup>o</sup> En hiver, du 7 novembre 1955 au 28 mars 1956, nous avons examiné, à intervalles plus ou moins éloignés, les matières fécales de 18 vaches adultes de race flamande stabulant dans deux étables belges différentes, 16 à la Station de recherches pour l'alimentation du bétail à Gontrode et 2 dans une ferme expérimentale à Melle.

2<sup>o</sup> En période estivale, du 8 mai au 3 septembre 1956, les examens ont été poursuivis chez 19 vaches de même race pâtrant sur *Lolium Perenne*. Douze animaux appartenaient à la Station de recherches de Gontrode, 4 à la ferme expérimentale de Melle et 3 autres à une ferme privée de Geluwe.

Tous les animaux étaient sains et en parfaite condition.

L'alimentation fournie aux vaches à l'étable était ainsi constituée : foin (*Poa pratensis*), maïs vert ensilé, pulpes de sucrerie, betteraves fourragères et aliment composé (tourteaux d'arachide, de lin et de colza, sels minéraux, son, froment et seigle). Ce même aliment composé était distribué aux animaux durant le pâturage, mais en petite quantité.

#### TECHNIQUES D'EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE.

Les matières fécales ont été prélevées entre 6 et 8 heures du matin et dès leur émission. Transportées aussitôt au laboratoire, elles étaient examinées une heure au plus après avoir été recueillies. Chez certains animaux, un seul prélèvement a été examiné ; chez d'autres, deux ou trois échantillons recueillis à dix jours d'intervalle ont été analysés. 1 g de fèces, pesé aseptiquement, était émulsionné dans 9 ml d'eau salée. La fine suspension obtenue était passée sur papier filtre stérile pour éliminer les débris de cellulose. Des volumes déterminés du filtrat étaient alors ensemencés en « goutte étalée » :

a) Sur les milieux solides suivants, répartis en boîte de Petri :

Gélose lactosée au bromo-crésol pourpre ; gélose au désoxycholate-citrate lactose selon Leifson ; gélose de Tcaque-Levine modifiée (E. M. B. Difco) ; milieu de Chapman salé à 75 p. 1 000 pour les staphylocoques ; gélose au lait digéré par la trypsine à pH 6 ou milieu de Rogosa modifié par Mabbitt [9] pour les *Lactobacillus* ; gélose au malt ; milieu de Simmons au citrate de sodium ; E. M. B. (Difco) additionné de 100 µg/ml d'auréomycine

et incubé en atmosphère contenant 30 p. 100 de CO<sub>2</sub>, pour la mise en évidence des *Candida*.

b) Sur les milieux liquides ci-dessous désignés : milieu de Rosenow [10] ; bouillon glucosé à l'azothydrate de sodium selon Litsky [11] pour les streptocoques fécaux ; milieu au sélénite et milieu au tétrathionate pour enrichissement des *Salmonella* ; ces deux derniers ont été inoculés, chacun, avec 2 g de fèces non diluées. Les spores de *Clostridium*, enfin, ont été recherchées par inoculation de 1 ml et 0,1 ml du filtrat chauffé à 80° durant dix minutes dans de la gélose glucosée profonde additionnée de sulfit de sodium et d'alun de fer.

Tous les milieux ensemencés ont été incubés aux températures habituelles adéquates. Les colonies des milieux solides ou celles obtenues après subculture des milieux liquides, ont été soumises à des réisolements de purification puis finalement à une identification complète. Sur les *Enterobacteriaceae* ne fermentant pas rapidement le lactose, nous avons d'abord effectué les tests simples décrits par l'un de nous [12].

#### RÉSULTATS.

Ils sont résumés dans le tableau I. Nous nous sommes contentés d'y signaler approximativement les proportions respectives des différentes espèces microbiennes présentes en l'évaluant ainsi : rares ; +, assez abondantes ; ++, abondantes et +++, très abondantes. Dans la dernière colonne du tableau figure le rapport des présences de chaque espèce dans les prélèvements recueillis en hiver d'une part et en été de l'autre.

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

La lecture du tableau I entraîne l'énoncé de quelques observations au sujet des espèces microbiennes présentes dans les matières fécales des vaches saines.

1<sup>o</sup> Coliformes : *Escherichia coli* est constant et très abondant ; il est le germe dominant de l'intestin des bovidés. Aucune des souches isolées n'appartenait aux sérotypes associés aux gastro-entérites infantiles : III : B4, 55 : B5, 26 : B6, 86 : B7, 125 : B15, 126 : B16, 127 : B8. *E. freundii* est plus fréquent en hiver qu'en été mais toujours rare en quantité. Il en est de même, sensiblement, pour *K. aerogenes*.

Les *Bethesda* sont présents respectivement dans 40 et 30 p. 100 des cas. Ils ne semblent pas être, pourtant, des hôtes permanents de l'intestin des vaches. Nous les avons trouvés seulement dans 2 des 3 prélèvements effectués à dix jours d'intervalle. On les ren-

contre surtout dans les fèces contenant en même temps des *E. freundii*; ceci confirme l'opinion de Kauffmann [13] qui réunit maintenant les deux espèces sous un même vocable. Pour les

TABLEAU I.

Espèces	Etable		Pâturage		Proportion relative de l'espèce	
	(18 vaches)		(19 vaches)			
	% Hiver	% été	Etable	Pâturage		
<i>Escherichia coli</i>	100	100	I	I	+++	
- <i>intermedium</i>	0	9,1			+	
- <i>freundii</i>	37	18,2	2		rares	
- <i>coli mutabilis</i>	0	4,5			rares	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	7,4	4,5	I,6		+	
<i>Diphtheroides</i>	7,4	4,5	I,6		+	
<i>Bethesda</i>	40,7	31,8	I,3		rares ou +	
<i>Paracolobactrum coliforme</i>	22,2	45,4	0,5		+	
- <i>intermedium</i>	0	18,2			rares	
- <i>aerogenoides</i>	II,1	13,6	0,8		rares	
<i>Proteus hauseri</i>	22,2	45,4	0,5		rares	
- <i>morganii</i>	II,1	4,5	2,4		rares	
- <i>rettgeri</i>	0	50			rares ou +	
<i>Providencia</i>	0	13,6			rares	
<i>Salmonella</i>	0	0				
<i>Shigella</i>	0	0				
<i>Lactobacillus homofermentaires</i>	37	27,3	I,3		+	
- <i>heterofermentaires</i>	18,5	18,2	I		+	
<i>Microbacterium</i>	25,9	22,7	I,I		+	
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	3			rare	
- <i>faecium</i>	100	100	I		+	
- <i>bovis</i>	25,9	36,3	0,7		+ ou +++	
- <i>lactis</i>	14,8	9,1	I,6		+	
<i>Bacillus licheniformis</i>	55,5	68,1	0,8		++	
- <i>pumilus</i>	48,1	68,1	0,7		++	
- <i>subtilis</i>	44,4	63,6	0,7		++	
- <i>megatherium</i>	37	40,9	0,9		+	
- <i>cereus</i>	33,3	9,1	3,6		+	
- <i>cereus-mycofides</i>	II,1	4,5	2,4		rare	
- <i>brevius</i>	25,9	22,7	I,I		+	
- <i>sphaericus</i>	18,5	13,6	I,3		+	
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0				
- <i>butyricum</i>	100	0			++	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,7	4,5	0,8		+	
<i>Alcaligenes tolerans</i>	18,5	9,1	2		rare	
<i>Bacterium anitratum</i>	22,2	13,6	I,6		rare	
<i>Serratia marcescens</i>	3,7	9,1	0,4		rare	
<i>Micrococci</i>	100	100			+ ou +++	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,4	4,5	I,6		rare	
<i>Candida krusei</i>	66,6	18,2	3,6		+	
- <i>tropicalis</i>	29,6	0			+	
- <i>pseudotropicalis</i>	14,8	0			+	
- <i>albicans</i>	0	0				

autres *B. paracoli*, on notera la plus grande fréquence des variétés coliformes.

2° *Proteus*: *Proteus hauseri* et *morganii* sont toujours en très petit nombre quand ils sont présents; on les isole seulement, le

plus souvent, à partir des milieux d'enrichissement pour les *Salmonella*, inoculés avec 2 g de fèces. Il faut signaler un phénomène curieux au sujet de *P. rettgeri*, observé d'ailleurs avec d'autres espèces bactériennes. Il est toujours absent dans le contenu intestinal des vaches à l'étable ; on le trouve au contraire et en assez grande abondance parfois durant la période de pâturage. Le rôle de l'alimentation est probable ; nous avons pu isoler à plusieurs reprises ce germe d'infusions d'herbes des prés des Flandres françaises.

3<sup>e</sup> Streptocoques fécaux : il est classique, maintenant, de placer dans ce groupe les espèces suivantes : *Str. faecalis*, *Str. zymogenes*, *Str. liquefaciens*, *Str. durans*, *Str. faecium* et *Str. bovis*. *Str. faecium* avait été individualisé par Orla Jensen en 1919 [14]. Skadhauge [15] a montré qu'il se différenciait des *Str. faecalis*, *zymogenes* et *liquefaciens* par son manque de résistance au tellurite de potassium (1/2 500). Shattock [16] a décrit les caractères distinctifs de cette espèce. Barnes [17] vient d'en signaler un nouveau : sur le milieu qu'elle a mis au point, *Str. faecium* ne réduit pas le chlorure de triphényltétrazolium. Barnes et Ingram [3] ont signalé que cette espèce se rencontrait à l'exclusion d'autres streptocoques fécaux, dans l'intestin du porc ; *Str. faecalis*, par contre, semble caractéristique de l'intestin humain. Cooper et Ramadan [18] n'ont pas rencontré le *Str. faecalis* typique dans 106 fèces de bovins et dans 110 de moutons. Nos résultats confirment ces travaux : *Str. faecalis* a été très rarement isolé de nos prélèvements et toujours en très petit nombre ; *Str. faecium*, par contre, a été trouvé dans 100 p. 100 des cas. *Str. bovis* est probablement plus fréquent qu'il n'apparaît à la lecture du tableau I ; son isolement reste parfois difficile dans les matières fécales. Une modification du milieu de Litsky [11] réalisée par l'un de nous et qui sera publiée ultérieurement, nous a permis, à la fin de ce travail, de le mettre en évidence plus souvent.

4<sup>e</sup> *Lactobacillus* : Rares ou absentes dans les fèces de l'homme adulte, ces bactéries représentent la flore dominante du tube digestif du porc ; après Willingale et Briggs [19], Raibaud, Caulet et Moequot [20] l'ont démontré. On sait également que *L. acidophilus* est constant et très abondant dans l'intestin du veau. Chez les bovins adultes, les *Lactobacillus* homo- et hétéro-fermentaires et les *Microbacterium* (Orla Jensen) sont encore assez abondants, mais ne se trouvent plus chez tous les animaux. Avec le milieu de Mabbitt [9] presque exclusivement utilisé à la fin de ce travail, nous avons trouvé un pourcentage de bovins hébergeant des *Lactobacillus* beaucoup plus élevé que celui indiqué dans le tableau I ; il est presque de 80 p. 100 durant les périodes d'hiver et d'été.

5° *Bacillus* : La flore fécale humaine est généralement exempte de *Bacillus* (formes végétatives ou spores) ; certains expliquent ce phénomène en admettant qu'ils peuvent être digérés par la trypsine. Chez la vache adulte, au contraire, ces bactéries sont fréquentes et souvent abondantes. Les espèces *licheniformis*, *pumilus* et *subtilis* se retrouvent plus souvent que les autres et sont quantitativement plus importantes en été. A côté de celles signalées dans le tableau I, nous avons exceptionnellement isolé quelques rares *Bacillus* du groupe *circulans*, actuellement soumis à des recherches complémentaires. Il ne faut donc pas négliger cette source fécale de contamination des laits par les *Bacillus*. Elle a une très grande importance pour l'avenir des produits destinés à la stérilisation et vient s'ajouter à celle antérieurement décrite par Ridgway [21]. Celui-ci considérait que la paille des litières était à l'origine des souillures par ces bactéries.

6° *Clostridium* : Deux faits importants méritent d'être signalés.

a) *Cl. butyricum* se trouve en grand nombre dans toutes les fèces des vaches durant la période d'hiver ; il disparaît en été. Ce phénomène s'explique facilement ; il est d'ordre alimentaire : les fourrages ensilés contiennent en abondance ce *Clostridium* et nous l'avons trouvé dans le maïs vert distribué aux animaux étudiés. Il démontre l'importance des modifications entraînées par la flore bactérienne des aliments ingérés sur les constituants microbiens de l'intestin des animaux. Il ne s'agit pas ici de l'influence de leurs divers principes nutritifs mais de celle des germes qu'ils apportent.

b) En dehors de cette espèce, il en existe d'autres, mais toujours en petit nombre. Elles appartiennent, en plus de *Cl. multi-fermentans*, à des types non encore décrits et étudiés en ce moment par Beerens à l'Institut Pasteur de Lille. Il faut remarquer l'absence totale de *Cl. perfringens*, hôte habituel de l'intestin humain. Ce fait, à priori surprenant, doit être confirmé par des études étendues à des lots de vaches séjournant dans d'autres régions ou locaux et recevant des alimentations différentes. Il paraît, en effet, illogique quand on sait la fréquence de ce germe dans les laits « sales ».

7° *Micrococcaceae*, *B. anitratum*, *Alcaligenes tolerans* : Les *Micrococci* existent dans 100 p. 100 des cas, en assez ou très grand nombre ; ce sont des espèces saprophytes. *Staphylococcus aureus* a été isolé en très petite quantité chez trois animaux ; il s'agissait d'espèces pathogènes, possédant une coagulase très active ; chose curieuse, elles étaient d'origine humaine car elles possédaient une hémolysine alpha pure et une fibrinolysine [22, 23].

*B. anitratum* a été signalé par Papavassiliou [24] dans des laits pasteurisés anglais et l'un de nous [25] avait recommandé sa

recherche dans ces produits. Notre étude explique son origine.

On connaît l'altération visqueuse du lait produite par *Alcaligenes viscosus*. Nous n'avons jamais rencontré ce germe au cours de nos examens mais avons isolé parfois une variété voisine de celle décrite par Abdel Malek et Gibson [26] sous le nom d'*Alcaligenes tolerans*. Comme les *Proteus*, elle possède la propriété de transformer la phényl-alanine en acide phényl pyruvique [27]; ce caractère n'avait pas encore été décrit chez les *Alcaligenes*.

8° *Candida*: Elles sont beaucoup plus fréquentes en hiver qu'en été. Ici, encore, ce phénomène est d'ordre alimentaire. Nous avons isolé, en effet, *C. krusei* dans les pulpes de sucreries distribuées aux animaux, à l'étable. *C. albicans* n'a jamais été rencontré.

9° *Salmonella* et *Shigella*: Aucun des bovins sains étudiés n'était porteur de *Salmonella*. Nous n'avons pas isolé, non plus, de *Shigella*, dans les conditions de notre étude. Nous rappelons, pourtant, que *Sh. sonnei* peut contaminer le veau [28].

Cette étude préliminaire est incomplète. Elle concerne seulement un nombre réduit de vaches adultes d'une seule race, soumises à une alimentation équilibrée propre aux modalités d'élevage d'une région. Il sera nécessaire de préciser si, dans d'autres conditions, les résultats enregistrés peuvent être sensiblement modifiés (alimentation déséquilibrée, climats et pâturages différents, etc.). Elle montre pourtant que la flore fécale de la vache se distingue de celles de l'homme et d'autres espèces animales. Elle est utile pour expliquer les origines des souillures bactériennes du lait : *Bacillus*, *Cl. butyricum*, *Candida*, *B. anitratum* en particulier. Elle indique à l'hygiéniste que les deux bactéries tests de contamination fécale bovine les plus sensibles sont *E. coli* et *Str. faecium* alors que *Cl. perfringens* est sans valeur jusqu'à plus ample informé. Elle prouve, enfin, l'influence importante des bactéries des aliments ingérés par l'animal sur l'aspect général de sa flore intestinale ; *Cl. butyricum* des maïs verts ensilés et *C. krusei* des pulpes de sucreries en sont deux exemples particulièrement démonstratifs.

## SUMMARY

### THE FECAL FLORA OF THE NORMAL COW.

The stools of 18 cows in the stable (during winter) and 19 grazing-cows (in summer), all of them receiving balanced food, have been studied in order to determine the constituents of the intestinal flora. The results (table I) can be summarized as follows.

1° The presence of *E. coli* is constant and abundant. The types

associated with infantile gastro-enteritis have not been found. The *Bethesda* (*E. freundii*) are rather frequent. There is only a small number of *Proteus hauseri* and *morganii*; the first one is rather often present, particularly in summer. *P. rettgeri* and *Providencia* are found in more than 50 % of the cases, but only in grazing-cows. *Salmonella* and *Shigella* have never been isolated.

*Str. faecalis* is always absent, but the presence of *Str. faecium* is constant. *Str. bovis* is less often found.

On Mabbit's medium it is possible to isolate *Lactobacillus* and *Microbacterium* in 80 % of adult cows.

Contrarily to the human intestine, that of the cow often contains *Bacillus*; the *licheniformis* and *subtilis* species are the most frequent.

The role plaid by food is demonstrated by two facts :

1° *Cl. butyricum* is abundant in feces of cows in the stable; it disappears in summer, because it is present in ensiled fodder, which is eaten only in winter.

2° A similar but less marked phenomenon is observed with *C. krusei* which is present in the pulps coming from sugar refineries, which constitute also the winter fodder.

A surprising fact which must be confirmed : *Cl. perfringens* has never been found.

*Micrococci* are encountered in 100 % of the specimens. *St. aureus* (coagulase +) is rare. *B. anitratum* is not exceptional.

To be valid, this study should be also made on cows from other regions, or receiving other kind of food. It however explains the origin of certain bacterial contaminations of milk and gives some precisions on the species due to a bovine fecal contamination.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DACK (G. M.). *Am. J. publ. Hlth*, 1955, **45**, 1151.
- [2] THATCHER (F. S.). *J. appl. Bact.*, 1955, **18**, 449.
- [3] BARNES (E. M.), INGRAM (M.) et INGRAM (G. C.). *J. appl. Bact.*, 1956, **19**, 204.
- [4] ANKERSMIT (P.). *Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes*. Diss. Lausanne, 1905.
- [5] VOGELER (L.). *Milchwirtschaftliche Forschungen*, 1930, **10**, 180.
- [6] BAUMANN (J.). *Untersuchungen über die Milchwirtschaftlichen wichtigen Bakterien in den Faeces des Rindes*. Diss. Zurich, 1934.
- [7] MARZENDORFER (M.). *Direkte und indirekte Keimzahlbestimmung des Duodenum und Rektuminhaltes von Rindern, sowie der Faeces von Menschen, unter besonderer Berücksichtigung der Zahl der Kolibakterien, Streptokokken und aeroben Sporenbildner*. Diss. Munchen, 1954.

- [8] HAENEL (H.) et MÜLLER-BEUTHOW (W.). *Zentr. Bakt. I.*, 1956, **167**, 123.
- [9] MABBITT (L. A.) et ZIELINSKA (M.). *J. appl. Bact.*, 1956, **49**, 95.
- [10] BUTTIAUX (R.) et FLAMENT (J.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1951, **4**, 149.
- [11] LITSKY (W.), MALLMANN (W. L.) et FIFIELD (C. W.). *Am. J. publ. Hlth*, 1953, **43**, 873.
- [12] BUTTIAUX (R.), MORIAMEZ (J.) et PAPAVASSILIOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 133.
- [13] KAUFFMANN (F.). *Enterobacteriaceae*. E. Munksgaards, édit., Copenhague, 1954.
- [14] ORLA-JENSEN (S.). *The lactic acid bacteria*. A. F. Host and Son, édit., Copenhague, 1919.
- [15] SKADHAUGE (K.). *Studies on Enterococci*. E. Munksgaards, édit., Copenhague, 1950.
- [16] SHATTOCK (P. M. F.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1955, **7**, 95.
- [17] BARNES (E.). *J. appl. Bact.*, 1956, **49**, 193.
- [18] COOPER (K. E.) et RAMADAN (F. M.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **12**, 180.
- [19] WILLINGALE (J. M.) et BRIGGS (C. A. E.). *J. appl. Bact.*, 1955, **18**, 284.
- [20] RAIBAUD (P.), CAULET (M.) et MOCQUOT (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 683.
- [21] RIDGWAY (J. D.). *J. appl. Bact.*, 1955, **18**, 374.
- [22] ROUNTREE (P.). *J. exp. Biol.*, 1947, **25**, 359.
- [23] PILLET (J.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 638.
- [24] PAPAVASSILIOU (J.). *Iatrikai Athinai*, 1955, vol. E', 523.
- [25] BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1950, **3**, 35.
- [26] ABDEL MALEK et GIBSON (T.). *J. Dairy Res.*, 1952, **19**, 294.
- [27] BUTTIAUX (R.), OSTEUX (R.), FRENOY (R.) et MORIAMEZ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 375.
- [28] DEOM (J.), MORTELMANS (J.) et BUTTIAUX (R.). *Bull. Acad. Vétér. France*, 1954, **27**, 379.

**LE SÉRUM ANTI-COQUELUCHEUX  
S'OPPOSE A LA SENSIBILISATION CONSÉCUTIVE  
A LA VACCINATION DE LA SOURIS  
PAR *HEMOPHILUS PERTUSSIS***

I. — RÉSISTANCE A L'HISTAMINE  
II. — RÉSISTANCE AUX ENDOTOXINES

par L. CHEDID et F. BOYER (\*).

(Laboratoire d'Endocrinologie, Collège de France,  
et Institut Pasteur, Service de Chimie Thérapeutique B)

**I. — RÉSISTANCE A L'HISTAMINE**

L'immunisation par *Hemophilus pertussis* (en phase I) rend les petits rongeurs environ cent fois plus sensibles à l'histamine.

Cette diminution de leur résistance, comparable à celle que l'on observe après surrénalectomie, ne s'observe que si l'on injecte un nombre très élevé de germes et n'est pas liée à la présence des anticorps, bien que pour l'obtenir il soit nécessaire d'injecter la souche en phase I, seule capable de vacciner [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Maitland et ses collaborateurs ont signalé que ce phénomène n'est pas lié à la présence de l'agglutinogène, mais à celle d'un facteur appelé HSF (histamin sensitizing factor) qui serait absent de la souche en phase IV. Le sérum de lapins immunisés par *H. pertussis* en phase I est capable de neutraliser HSF *in vitro* et *in vivo*, c'est-à-dire de s'opposer à la sensibilisation à l'histamine consécutive à la vaccination. Les auteurs de ce travail admettent qu'il existe dans ce sérum, en plus des anticorps agglutinants, une substance anti-HSF qu'il est difficile d'isoler [7].

Les expériences que nous rapportons ici confirment ce travail et démontrent que ces propriétés protectrices peuvent se manifester au cours de l'immunisation active.

(\*) Manuscrit reçu le 4 novembre 1957.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Dans toutes nos expériences l'histamine, sous forme de chlorhydrate, et la suspension d'*H. pertussis* (phase I) contenant 120 milliards de germes au millilitre, formolée à 2 p. 1 000, sont administrées par voie intraperitoneale.

Le sérum anti-coquelucheux (globulines anti-coquelucheuses anti-phase I préparées à l'Institut Pasteur) est injecté par voie intraperitoneale. Il agglutine à 1/60 000.

L'échantillon n° 1 de sérum anti-HSF a été préparé chez quatre lapins par injection intraveineuse d'une suspension contenant 10 milliards de germes, trois fois par semaine, pendant trois semaines, puis une seule fois par semaine pendant encore trois semaines et, dans certains cas, six semaines.

L'échantillon n° 2 provient de deux lapins vaccinés dans les mêmes conditions mais avec des germes préalablement chauffés, en ampoules scellées, à 57° pendant une heure.

Le pouvoir agglutinant des sérums a été mesuré par la méthode des dilutions successives. Pour les détails de la technique se reporter à [6].

Dans ces conditions les taux d'agglutination trouvés furent les suivants :

	22 <sup>e</sup> JOUR	28 <sup>e</sup> JOUR	45 <sup>e</sup> JOUR
Echantillon n° 1 .....	1/20 000	1/20 000	1/40 000
Echantillon n° 2 .....			1/6 000

L'endotoxine (ASED) extraite sous forme d'antigène glucido-lipidique par la méthode de Boivin de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) tue la souris normale à la dose de 0,5 mg et la souris surrenalectomisée à une dose cent fois plus petite [8].

Toutes les expériences ont été réalisées chez des souris mâles, car il a été démontré qu'il existe chez la souris une différence de sensibilité liée au sexe [5, 9].

## RÉSULTATS.

1<sup>o</sup> *L'injection préalable d'endotoxine peut, dans certaines conditions, gêner l'élaboration des anticorps sans toutefois s'opposer à la sensibilisation à l'histamine.* — Si l'on injecte à des souris de faibles doses répétées d'endotoxine en même temps que le vaccin anti-coquelucheux, le taux d'agglutination de leur sérum sera moins élevé que celui des témoins.

## EXPÉRIENCE.

a) Des souris sont vaccinées, par voie intrapéritonéale, avec 16 milliards de germes pendant trois jours consécutifs. Certaines d'entre elles reçoivent 0,1 mg d'endotoxine (ASED) la veille et une heure avant chaque vaccination. Neuf jours plus tard, le sérum des souris qui ont reçu l'endotoxine n'agglutine pas tandis que celui des témoins agglutine au 1/60, et au dix-huitième jour le sérum de ces mêmes souris agglutine au 1/60 alors que celui des témoins agglutine au 1/240.

Ces résultats, bien qu'inconstants, s'obtiennent assez régulièrement, si l'on injecte l'endotoxine à dose suffisante pour choquer l'animal. Dans ces conditions, la sensibilité à l'histamine est augmentée comme chez les témoins.

b) Des souris sont vaccinées avec une seule dose de 60 milliards de germes. Certaines d'entre elles reçoivent 0,1 mg d'endotoxine quarante-huit heures avant la vaccination, puis de nouveau deux jours plus tard. On mesure leur sensibilité à l'histamine ainsi que le pouvoir agglutinant de leur sérum neuf jours après la vaccination.

TABLEAU I.

	Dose d'Histamine (mg)				Pouvoir agglutinant
	0,5	1	2	5	
Témoins vaccinés	2/10	1/10	0/5	0/5	1/60 <sup>e</sup>
Vaccinés Endotoxine	2/9	1/10	0/5	0/5	0

Numérateur, nombre de souris survivantes. Dénominateur, nombre de souris traitées.

La sensibilisation à l'histamine semble être indépendante du pouvoir agglutinant du sérum.

2<sup>o</sup> Immunisation passive et action anti-HSF. — Des souris vaccinées au moyen de 16 milliards de germes par jour pendant trois jours consécutifs sont réparties en trois lots. Le premier lot reçoit du sérum de cheval normal, le deuxième, des globulines anti-coquelucheuses et le troisième, du sérum de lapin immunisé (échantillon n° 1).

Ces sérum sont injectés sous un volume de 0,25 ml une heure avant chaque vaccination.

Ces souris, ainsi qu'un lot de témoins non vaccinés, recevront de l'histamine à différentes doses six jours après le début de la vaccination.

Alors que 8 mg d'histamine tuent 50 p. 100 des souris témoins

vaccinées et ayant reçu du sérum de cheval, toutes les souris vaccinées et qui ont reçu des globulines anti-coquelucheuses ou du sérum de lapins immunisés tolèrent 32 mg d'histamine comme les témoins non vaccinés.

Cette expérience confirme les résultats de Maitland et démontre que les globulines anti-coquelucheuses sont riches en facteur anti-HSF.

*3<sup>e</sup> Immunisation active et action anti-HSF.* — Cette substance, capable de s'opposer aux effets nocifs de la vaccination anti-coquelucheuse, peut-elle s'élaborer aussi au cours de l'immunisation active? C'est ce que nous constaterons dans les expériences suivantes.

*Première expérience :* Des souris sont vaccinées de la manière suivante : 25 milliards de germes les 14, 16, 18, 20, 22 et 24 mars ; 16 milliards de germes les 27, 28 et 29 mars. Les 3, 4 et 5 avril on leur injecte à nouveau, en même temps qu'à des témoins, 16 milliards de germes.

Le 9 avril, leur sérum agglutine au 1/3 000, cependant leur sensibilité à l'histamine est la même que celle des témoins.

TABLEAU II.

	Dose d'Histamine (mg)		
	1	2	5
Témoins vaccinés 3 fois	3/10	3/10	0/4
Souris hyperimmunisées	2/10	2/10	0/4

Cette expérience démontre qu'une vaccination utilisant de faibles doses de vaccin au début ne permet pas l'élaboration du facteur anti-HSF dans l'organisme des souris.

Il en va tout autrement si la vaccination est faite au moyen d'un nombre de germes plus élevé et pendant plus longtemps.

*Deuxième expérience :* Des souris reçoivent 16 milliards de germes les 11, 12 et 13 juin. Après une sensibilisation initiale à l'histamine elles ont récupéré une résistance normale le 2 juillet puisqu'elles tolèrent à cette date 5, 10 et même 20 mg d'histamine (lots de 12, 12 et 4 souris).

On les revaccine alors avec 5 milliards de germes le 3 et le 10 juillet, puis en même temps que des témoins neufs avec 16 milliards de germes les 15, 16 et 17 juillet.

Le 20 juillet, alors que leur sérum agglutine à 1/8000 leur résistance à l'histamine est très supérieure à celle des témoins vaccinés par trois injections seulement.

TABLEAU III.

	Dose d'Histamine (mg)		
	5	10	20
Témoins vaccinés 3 fois	1/5	0/3	-
Souris hyperimmunisées	13/13	12/12	4/4

Cette expérience démontre qu'une immunisation intense et prolongée par *H. pertussis* rend l'animal réfractaire à l'effet de sensibilisation consécutif à une nouvelle vaccination anti-coqueluchouse.

Ce résultat nous paraît intéressant dans la mesure où le mécanisme de la sensibilisation à l'histamine se rapporte à un phénomène, très général, celui de la défense spécifique.

Les expériences suivantes mettent en évidence le rôle protecteur de l'immunisation passive et active à l'égard des endotoxines.

## II. — RÉSISTANCE AUX ENDOTOXINES

*Sérum anti-HSF et réapparition de l'action anti-endotoxique de la cortisone chez la souris vaccinée.* — La sensibilité des souris aux endotoxines est augmentée, bien qu'à un degré moindre que pour l'histamine, au cours de la vaccination par *H. pertussis* à fortes doses [40, 41, 42]. De plus, l'action anti-endotoxique de la cortisone ne se manifeste plus chez la souris immunisée dans ces conditions.

Tous ces phénomènes, qui ne sont pas liés à la présence des anticorps circulants, ont été signalés et discutés précédemment [6]. Cette étude nous avait permis d'envisager l'existence d'un lien entre la défense non spécifique et la défense immuno-logique.

Les résultats que nous apportons ici indiquent qu'il est possible de restituer à la souris immunisée par *H. pertussis* une résistance normale en lui injectant un sérum riche en substances anti-HSF.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La cortisone est injectée par voie sous-cutanée une heure avant l'endotoxine.

Le vaccin et les sérum anti-coqueluchéaux ont été utilisés dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes. Les sérum antirabique et antidiphétique (préparés par l'Institut Pasteur) ont été administrés par voie intrapéritonéale (0,5 ml) une heure avant chaque vaccination.

## RÉSULTATS.

1<sup>o</sup> IMMUNISATION PASSIVE ET ACTION ANTI-HSF. — a) Chez la souris surrénalectomisée. — La cortisone perd ses propriétés anti-endotoxiques chez la souris surrénalectomisée lorsque celle-ci a été vaccinée au préalable avec *H. pertussis*. Cependant, l'administration de globulines anti-coquelucheuses restitue une protection hormonale efficace.

*Expérience*: Des souris reçoivent sept jours avant l'injection d'endotoxine une seule dose de 50 milliards de germes. La surrénalectomie est faite quarante-huit heures avant l'injection du poison et vingt-quatre heures après l'administration de 0,5 ml de sérum de cheval ou de globulines anti-coquelucheuses. Des souris neuves non vaccinées sont surrénalectomisées le même jour.

Tous ces animaux reçoivent 0,05 mg d'endotoxine une heure après 1 mg de cortisone.

TABLEAU IV.

		Survie en 24 h.
Non - Vaccinés	Témoins Endotoxine	1/11
	Cortisone + Endotoxine	11/11
Vaccinés	Cortisone + Endotoxine	0/11
	Serum de Cheval + Cortisone + Endotoxine	0/6
	Globuline + Cortisone + Endotoxine	4/11

b) *Chez la souris non surrénalectomisée*. — L'action anti-toxique de la cortisone se manifeste aussi chez la souris non surrénalectomisée. Elle est beaucoup plus nette si l'on injecte le sérum anti-HSF, une heure avant la vaccination.

Dans cette expérience des souris sont vaccinées au moyen de 16 milliards de germes trois jours consécutifs. Certaines d'entre elles reçoivent à chaque fois, une heure avant la vaccination, 0,5 ml de l'un des différents sérums. Cinq jours après le début de la vaccination on injecte 0,5 mg d'endotoxine, une heure après 2 mg de cortisone.

Le tableau V résume les résultats de huit expériences.

Ces résultats mettent en évidence l'action efficace des sérums anti-coquelucheux, même lorsque leur pouvoir agglutinant est faible (échantillon n° 2). De plus, il semble que le sérum antirabique

TABLEAU V.

		Survie en 24 h. (nombre)	%
Non - Vaccinés	Témoins Endotoxine	18/62	29
	Témoins Serum de Cheval + Endotoxine	0/12	0
	Cortisone + Endotoxine	59/72	82
	Cortisone + Serum de Cheval + Endotoxine	7/12	58
Vaccinés	Cortisone + Endotoxine	7/32	22
	Cortisone + Serum de Cheval + Endotoxine	34/106	32
	Cortisoné + Serum de Lapin I + Endotoxine	8/12	66
	Cortisone + Serum de Lapin II + Endotoxine	16/23	70
	Cortisone + Globulines + Endotoxine	85/97	87
	Cortisone + Rabique + Endotoxine	48/84	57
	Cortisone + Diphtérique + Endotoxine	3/24	12

possède à un degré moindre, mais tout de même net (1), ce même pouvoir. Par contre, le sérum antidiphétique est inactif.

2° IMMUNISATION ACTIVE ET ACTION ANTI-HSF. — L'hyperimmunisation, pour être effective, doit être intense et prolongée.

*Première expérience :* Des souris reçoivent 2,5 milliards de germes les 14, 16, 18, 20, 22 et 24 mars, puis 16 milliards les 27, 28 et 29 mars, et de nouveau 16 milliards de germes les 3, 4 et 5 avril, en même temps que des souris neuves.

A tous ces animaux, ainsi qu'à des témoins non vaccinés on injecte 0,5 mg d'endotoxine une heure après 2 mg de cortisone le 8 avril, après avoir prélevé du sang à certaines d'entre elles pour mesurer son pouvoir agglutinant.

TABLEAU VI.

	Survie en 24 h	Survie en 48 h	Pouvoir Agglutinant
Non - Vaccinés	Témoins Endotoxine	2/10	I/10
	Cortisone + Endotoxine	10/10	—
Vaccinés 3 fois + Cortisone + Endotoxine	7/20	5/20	I/30e
Hyperimmunisés + Cortisone + Endotoxine	10/20	4/20	I/3000e

(1) L'action du sérum antirabique se révèle très significative statistiquement (test de l' $\chi^2$ ).

Remarquons ici que l'expérience a duré vingt-cinq jours et que la dose de globulines qui protège efficacement la souris, confère au sérum de celle-ci un pouvoir agglutinant à 1/5 000.

L'expérience qui suit montre qu'il est possible d'obtenir le même résultat par une immunisation active, à condition qu'elle soit plus intense et plus prolongée.

*Deuxième expérience* : Des souris sont vaccinées à l'aide de 16 milliards de germes les 11, 12 et 13 juin, puis avec 5 milliards de germes les 3 et 10 juillet. On leur injecte à nouveau 16 milliards de germes, en même temps qu'à des témoins neufs les 15, 16 et 17 juillet.

A tous les animaux, ainsi qu'à des témoins non vaccinés, on injecte le 20 juillet, 0,5 mg d'endotoxine une heure après 2 mg de cortisone.

TABLEAU VII.

	Survie en		Pouvoir Agglutinant
	24 h	48 h	
Non - { Témoins Endotoxine	7/40	7/40	-
Vaccinés { Cortisone + Endotoxine	30/40	30/40	-
Vaccinés 3 fois +Cortisone+Endotoxine	7/20	3/20	1/40e
Hyperimmunisés + Endotoxine	6/35	3/35	1/18000e
Hyperimmunisés +Cortisone+Endotoxine	45/55	32/55	1/18000e

Dans cette expérience qui a duré quarante jours et où le pouvoir agglutinant du sérum est particulièrement élevé, l'immunisation active prolongée a permis à la cortisone de manifester pleinement son action antitoxique malgré la nouvelle vaccination.

#### CONCLUSIONS.

Chez la souris vaccinée par *H. pertussis* en phase I, l'histamine devient environ cent fois plus toxique et la cortisone perd son pouvoir protecteur vis-à-vis des endotoxines. Nous avons précédemment signalé ce phénomène en indiquant qu'il n'était pas lié à la présence des anticorps.

Pour Maitland et ses collaborateurs, le pouvoir histamino-sensibilisant du vaccin anti-coquelucheux serait indépendant de l'agglutinogène et lié à un facteur HSF (histamine sensitizing factor). Ces auteurs ont montré que le sérum du lapin immunisé par *H. pertussis* s'oppose à cette action sensibilisante parce qu'il posséderait un facteur anti-HSF.

Dans le présent travail, nous confirmons que le sérum de lapin immunisé protège la souris vaccinée par *H. pertussis*, contre des doses d'histamine habituellement mortelles dans ces mêmes conditions. De plus, nos résultats démontrent que :

1<sup>o</sup> Cette action n'est pas liée au taux d'anticorps anti-coquelucheux, car un sérum de lapin dont le pouvoir agglutinant est faible exerce néanmoins une protection très efficace.

2<sup>o</sup> Les globulines anti-coquelucheuses (sérum de cheval immunisé et purifié) sont très riches en facteur anti-HSF.

3<sup>o</sup> L'immunisation active par *H. pertussis*, à condition d'être intense et prolongée, met l'animal à l'abri d'une chute de résistance ultérieure consécutive à la vaccination anti-coquelucheuse.

4<sup>o</sup> D'autre part, un sérum riche en facteur anti-HSF permet à la cortisone d'exercer son activité anti-endotoxique chez la souris vaccinée, qu'elle soit surrénalectomisée ou non. Ce phénomène, qui est particulièrement net avec les globulines anti-coquelucheuses, s'observe aussi avec le sérum antirabique, mais pas avec le sérum antidiphétique.

5<sup>o</sup> Enfin, il est aussi possible de s'opposer à cette disparition de l'action antitoxique de la cortisone par une hyperimmunisation active et prolongée de la souris.

## SUMMARY

ANTI-*pertussis* SERUM INHIBITS THE SENSITIZATION FOLLOWING IMMUNIZATION WITH *H. pertussis* IN MICE.

I. — RESISTANCE TO HISTAMINE.

II. — RESISTANCE TO ENDOTOXIN.

In mice resistance to histamine decreases a hundredfold and the action of cortisone (towards bacterial endotoxins) vanishes during immunization with *H. pertussis*.

Maitland and coworkers believe that there exists a histamine-sensitizing factor (HSF) in the *pertussis* vaccine, the effect of which may be inhibited by the serum of immunized rabbits, because of the presence in such a serum of an anti-HSF factor.

Our experiments confirm these results and show that :

1. During passive immunization, the protective action of rabbit serum is independent of its *pertussis* antibodies level.

2. Anti-*pertussis* globulins (Pasteur Institute purified horse serum) have a very high anti-HSF activity.

3. Active immunization by *H. pertussis*, if prolonged and intensive, can also protect mice against the depressive effects of *pertussis* vaccine.

4. A serum possessing a high anti-SHF activity restores the antitoxic power of cortisone, if injected into immunized, adrenalectomized or normal mice. This effect, which is easily demonstrated with anti-*pertussis* globulins, may also be observed with antirabic, but not with antidiphtheric serum.

5. Prolonged and intensive active immunization may also restore the antitoxic action of cortisone in mice.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] PARFENTJEV (I. A.) et GOODLINE (M. A.). *J. pharm. exp. Therap.*, 1948, **92**, 411.
- [2] HALPERN (B. N.) et ROUX (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 923.
- [3] MALKIEL (S.) et HARGIS (B. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **81**, 689.
- [4] KIND (L. S.). *J. Allergy*, 1953, **24**, 52.
- [5] CHEDID (L.). *Ann. Endocrinol.*, 1954, **15**, 746.
- [6] CHEDID (L.) et BOYER (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **94**, 380.
- [7] MAITLAND, KOHN et MAC DONALD. *J. Hyg.*, 1955, **53**, 196.
- [8] CHEDID (L.), BOYER (F.) et SAVIARD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 213.
- [9] PITTMAN (M.). *J. inf. Dis.*, 1951, **89**, 296.
- [10] MALKIEL (S.) et HARGIS (B. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **80**, 122.
- [11] KIND (L.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 411.
- [12] PARFENTJEV (J. A.). *Yale J. biol. Med.*, 1954, **27**.

**RECHERCHES**  
**SUR LA DISSOCIATION SPONTANÉE**  
**DES PSEUDOMONAS**

par Andrée SUIRE (\*).

(Laboratoire de Microbiologie  
de la Faculté de Médecine de Montpellier)

L'augmentation actuelle du nombre des *Pseudomonas* dans les prélèvements hospitaliers a amené entre nos mains depuis deux ans plus d'une centaine de ces microbes. Notre propos n'est pas de rechercher ici les causes de cette multiplication et son incidence pathologique, mais de rapporter les observations que nous avons pu faire sur ces germes désormais plus fréquents, dans les produits émanant des divers services hospitaliers (urines, pus, liquides gastriques, bile, expectorations, etc.).

Nous avons retenu ces germes au fur et à mesure que nous les rencontrions et procédé à un isolement sur milieu E. M. B. de Levine. Il est alors apparu que, sur ce milieu, les souches de *Pseudomonas* sont assez souvent hétérogènes dès leur sortie de l'organisme, présentant sur la même boîte des colonies très différentes. Dans 18 p. 100 des cas, la culture semblait « panachée », les deux types de colonies étant de couleur très distincte.

Premier type : colonies rose vif (RV) ou lilas ;

Deuxième type : colonies claire (Cl), rose très pâle ou gris.

Chaque fois que s'est présentée une telle dissociation, nous avons repiqué séparément les deux types et étudié leurs caractères respectifs pour savoir si, à cette différence de couleur s'ajoutaient d'autres caractères. Nous avons pu, ainsi, constater d'importantes différences d'aspect et de comportement que nous nous sommes efforcée de préciser et de classer.

A. La différence porte sur la présence ou l'absence de pigment bleu.

Ce fait n'exclut pas l'association d'autres modifications.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 novembre 1957.

B. La différence porte sur un caractère autre que la présence ou l'absence de pyocyanine. On trouve alors, côté à côté, deux formes de *P. fluorescens*.

Nous avons étudié ces *Pseudomonas* dissociés et noté les caractères des deux lignées — lignée rose vif et lignée claire — d'une même souche : pyocyanine, aspect de la culture sur gélose, sur milieu de Koser et sur sérum coagulé, plages de « lyse » ou area, odeur typique, présence de SH<sub>2</sub> dans le milieu, sensibilité à la polymyxine.

Ainsi, il a été possible d'établir pour chaque *Pseudomonas* spontanément dissocié, deux fiches permettant de comparer les manifestations de sa forme « RV » et de sa forme « Cl » (cette dernière représentant probablement le mutant). Le tableau I reproduit, à titre d'exemple, quelques fiches de *Pseudomonas* dissociés.

Passons en revue ces différents caractères, afin de déterminer dans quelle mesure ils peuvent être rapportés à l'un ou l'autre type.

**PYOCYANINE.** — Pigment bleu, phénazinique, soluble dans le chloroforme, caractéristique de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Les bacilles qui possèdent ce pigment sont tous du premier type (RV) ; nous n'avons pas rencontré de souches claires qui aient la pyocyanine. Cependant, il ne faut pas conclure que les colonies RV sont toujours porteuses de ce pigment : dans plusieurs cas, nous avons relevé des dissociations donnant naissance à deux lignées de *P. fluorescens*. Les germes 8913, 8954, 8421, par exemple, donnent une culture hétérogène : ni les RV ni les Cl ne produisent de pyocyanine, mais ils diffèrent sur les autres points : aspect de la culture, forme des areas, etc.

On peut admettre que le pigment bleu est l'apanage de la lignée RV, mais il n'en est pas un caractère obligatoire.

**ASPECT DE LA CULTURE.** — a) Sur gélose : coloration toujours plus intense de la lignée RV. S'il s'agit d'un RV Pyo + l'explication est simple et ce fait découle du précédent : seuls les RV ont la pyocyanine. Si, au contraire, la dissociation a donné deux *P. fluorescens* (*Cf.* 8421) cette explication ne convient plus. Nous admettrons provisoirement que les RV sont plus riches en pigments.

b) Sur milieu de Koser : la lignée RV est plus colorée, en bleu ou vert, même si le RV est Pyo —.

La plupart des colonies Cl poussent sur ce milieu en donnant un trouble incolore.

c) Sur sérum coagulé : on retrouve la coloration obtenue sur

TABLEAU I.

	5859	8243	8421	8437	8913
Colorur sur E.M.B. . . . .	rose vif +	rose clair —	rose vif —	rose clair —	rose vif —
Pyocyanine . . . . .	bleu +	incolore —	bleu vif —	bleu pâle —	gris —
Koser . . . . .	bleu vert . . . . .	jaunâtre . . . . .	jaune 0	jaune 0	vert pâle . . . . .
Aspect sur gélose. . . . .	plages étendues	0	vert vif	vert jaune	jaune 0
Plages de lyse . . . . .	blanc +	blanc +	blanc 0	blanc 0	culture lisse
Sérum coagulé. . . . .	bleu +	vert +	traces 0	bleu pâle ++	vert pâle —
SH <sub>2</sub> . . . . .	0 +	+ +	+ +	+ 0	0 +
Odeur caractéristique. . . . .	—	—	—	+	—
Pigmentation noire tardive . . . . .	+	—	—	+	—
	8619	8954	608	9649	9483
Colorur sur E.M.B. . . . .	rose vif +	rose clair —	rose vif —	rose pâle —	rose clair —
Pyocyanine . . . . .	incolore +	incolore —	bleu vif +	incolore —	rose vif —
Koser . . . . .	bleu vert . . . . .	jaune 0	bleu vert 0	bleu pâle 0	vert pâle . . . . .
Aspect sur gélose . . . . .	plages très lysée	lysé	lysé 0	lysé 0	vert pâle . . . . .
Plages de lyse . . . . .	blanc bleu	blanc bleu	bleu pâle bleu	bleu pâle bleu	surface lysée . . . . .
Sérum coagulé. . . . .	bleu vert —	— +	+ 0	— ++	vert pâle . . . . .
SH <sub>2</sub> . . . . .	0 +	+ +	+ +	+ +	blanc . . . . .
Odeur caractéristique. . . . .	—	—	+	—	piqué très fin
Pigmentation noire tardive . . . . .	—	—	+	+	blanc +

gélose. La liquéfaction du sérum coagulé est quelquefois plus rapide chez le RV que chez son mutant Cl.

**PLAGES DE LYSE OU AREA.** — Presque toutes nos souches RV ont été atteintes par des processus lytiques, soit superficiels et étendus, donnant le reflet métallique, soit circulaires et profondément creusés dans la culture sur milieu solide. Il est aussi possible de voir ces plages à tendance extensive sur le voile qui se forme au-dessus des cultures en bouillon si on les observe sans les agiter.

Les *Pseudomonas* Cl ne présentent pas cette extrême sensibilité à la lyse ; ils ont, en général, une culture lisse et brillante ou bien semée d'un très fin piqueté qui ne tend pas à l'accroissement ni à la confluence.

Il est possible que cette règle ne soit pas absolue, mais nous l'avons trouvée vérifiée chez toutes nos souches.

**ODEUR DES *Pseudomonas*** — Plusieurs auteurs considèrent l'odeur des *Pseudomonas* comme un caractère important. Topley la décrit fade (mawkish). Il est habituel de la comparer à celle des fleurs mellifères. Bourse, dans sa thèse de 1956 la trouve présente et de même intensité dans toutes les souches. Seules, les souches « dégradées », dit-il, ont perdu cette odeur.

Pour nous :

a) L'odeur caractéristique est parfois intense : ++.

Uniquement chez les RV.

b) L'odeur est perceptible mais faible : +.

Chez les RV et rarement chez les Cl.

c) L'odeur est nulle : 0.

Chez les souches claires.

La perte de l'odeur caractéristique paraît correspondre à une mutation dans le sens RV → Cl, et, si l'on considère la disparition parallèle de plusieurs autres caractères, on est amené, en effet, à parler de dégradation.

Rarement, les *Pseudomonas* ont, ou acquièrent une odeur fécaloïde (souche 1367). Ce sont alors des germes difficiles à étiquer, car ils sont apigmentés.

**PRODUCTION DE SH<sub>2</sub>.** — Pas de conclusion nette dans ce domaine.

**SENSIBILITÉ A LA POLYMYXINE.** — Le comportement des deux lignées à l'égard des antibiotiques est-il différent ? Nous avons étudié, pour commencer, l'action de la polymyxine, car les autres antibiotiques sont trop souvent inactifs sur les *Pseudomonas* pour permettre de nombreux tests comparatifs.

Voici nos premiers résultats : les deux lignées n'ont pas obliga-

toirement une différence de sensibilité considérable, mais cette différence peut néanmoins exister ; les *Pseudomonas* 8619 et 8913 sont très sensibles à la polymyxine en forme RV et très résistants en forme Cl (tableau II). Mais, le plus souvent, la sensibilité varie de deux tubes au plus ; cette différence ne paraît pas suffisamment grande pour être prise en considération, de petits détails de technique pouvant en être la cause (inoculat un peu plus important, petites variations de température selon la place dans l'étuve...).

TABLEAU II. — Sensibilité des *Pseudomonas* dissociés à la polymyxine.

Souche	Forme	Sensibilité			
608	RV	sensible à 30 microgrammes par cm <sup>3</sup>			
	Cl	"	30	"	"
9649	RV	"	15	"	"
	Cl	"	30	"	"
8619	RV	"	3,7	"	"
	Cl	résiste à 100			
8913	RV	sensible à 0,1			
	Cl	résiste à 100			
8437	RV	sensible à 0,1			
	Cl	"	62	"	"

D'ailleurs, nous avons constaté des différences de cet ordre chez les colonies d'une même lignée ou « colonies-sœurs ».

Ces faits sont un peu difficiles à expliquer, à moins d'admettre que, dans les cas 8619 et 8913 il y avait vraiment deux souches différentes de *Pseudomonas*, contemporaines chez un même malade. Cette explication est d'autant plus plausible que, pour ces microbes, la dissociation initiale RV <sup>RV</sup> <sub>Cl</sub> n'a pu être reproduite.

TABLEAU III. — Tableau récapitulatif  
des caractères observés dans les deux lignées.

	Lignée RV	Lignée Cl
Pyocyanine	Fréquemment	Jamais
Aspect en gélose	coloration intense	coloration pâle
Koser	coloration vive	coloration pâle
sérum coagulé	id.	id.
Plages de lyse	fréquentes, étendues	culture lisse ou fin piqueté
Odeur	++ ou +	+ ou 0
SH <sub>2</sub>		
Sensibilité à la Polymyxine	pas de caractères notables	

Devant ces constatations plusieurs questions se posent :

1° Les différences notées entre les deux types de colonies (aspect de la culture, pigment bleu, etc.) sont-elles réellement liées à la forme RV ou Cl sur milieu E. M. B. ; ou, au contraire, peut-on trouver au sein d'une même lignée des colonies à caractères dissemblables ?

2° Le milieu E. M. B. sur lequel nous avons remarqué la dissociation a-t-il un rôle essentiel dans le déclenchement de celle-ci ?

3° La capacité de dissociation d'une souche donnée se transmet-elle à sa descendance, ou s'agit-il d'un phénomène unique à la sortie de l'organisme ?

Pour répondre à ces trois questions essentielles, nous avons fait une série d'essais que voici brièvement résumés.

1° Chaque lignée (RV et Cl) a été ensemencée en suspension très diluée, afin d'obtenir des colonies isolées. Ces colonies, numérotées A, B, C, D, E, F, etc., sont alors repiquées sur gélose et leurs caractères étudiés.

Nous les avons trouvées, pour une même lignée, absolument identiques : aspect sur gélose, coloration de la culture à l'isolement et après plusieurs jours, même type de lyse, odeur d'égale intensité. Ces « colonies-sœurs » ont donc les mêmes caractères. Quand les caractères des colonies sont différents, ce fait est objectivé au premier coup d'œil par un « panachage » de la culture de départ sur E. M. B.

2° Il a été suffisamment parlé de ce milieu E. M. B., point de départ de nos observations, pour que nous cherchions à déterminer s'il a un rôle dans l'apparition des souches dissociées : l'isolement des *Pseudomonas* a été simplement poursuivi sur gélose ordinaire coulée en boîtes de Petri. Les souches donnant lieu à dissociation ont produit une culture hétérogène. Ici, ce n'est pas la couleur de la colonie qui attire l'attention, puisque le bouillon gélosé ne contient pas de colorant, mais l'opacité ou

la transparence de ces colonies, surtout si on les examine devant un fond noir ou une source lumineuse.

Nous avons noté, sur gélose, deux types de colonies : des colonies opaques présentant presque toutes un point de lyse en leur centre, et des colonies transparentes, non lysées (*Cf. fig. 1*). Ces deux types ont été repiqués et leurs caractères contrôlés. Cette vérification a permis de superposer les colonies opaques aux RV et les colonies transparentes aux Cl.

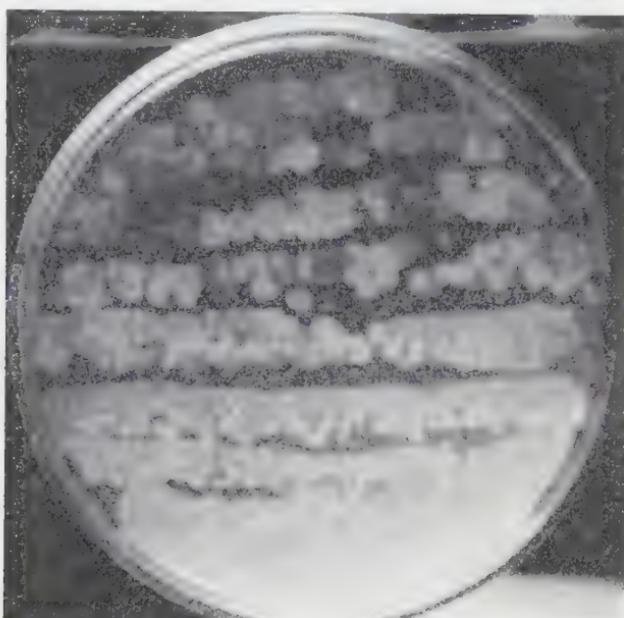


FIG. 1. — Dissociation du *Pseudomonas* 9649. Lignée RV dissociée sur gélose ordinaire (vue par transparence). Les colonies opaques correspondant aux « RV » sur milieu E. M. B. ont, en leur centre, un point de lyse visible sur la photo.

Les colonies transparentes correspondent aux colonies Cl.

La dissociation de nos souches ne paraît donc pas être une conséquence de la mise en culture sur milieu de Levine.

3° Les deux lignées séparées sur plaque de gélose ou de E. M. B. et que nous continuerons à nommer RV et Cl vont-elles conserver leurs caractères respectifs lors des repiquages ? Pour nous faire une opinion sur ce problème, nous avons abandonné pendant plusieurs semaines ces souches sur bouillon gélosé en tubes non scellés, à la température du laboratoire, ou en gélatine

nutritive à +4°, méthode recommandée par Gessard pour la conservation des *Pseudomonas*.

Soit, pour un germe donné, deux cultures ; l'une descendant d'une colonie rose vif, l'autre descendant d'une colonie claire.

La lignée RV présente une forte dissociation RV  $\swarrow$  colonies RV. Cl  $\searrow$  colonies Cl

La lignée Cl reste homogène.

Pour prendre un exemple concret, observons le comportement du *Pseudomonas* 608 qui, à l'isolement, a donné deux lignées bien distinctes.

La première lignée est RV : Pyo+, Lyse+, Couleur bleu vert, Odeur+.

La deuxième lignée est Cl : Pyo-, Lyse-, Couleur vert jaune, Odeur 0.

La lignée RV se dissociera à son tour dans la proportion approximative de 20 RV pour 100 colonies (cette proportion n'est pas stable), alors que la lignée Cl restera entièrement Cl.

Il importe, ensuite, de vérifier si les colonies claires nouvellement apparues dans la souche RV ont bien les caractères Cl. Cette recherche a été faite et a montré que la mutation apparue dans la lignée RV n'est pas isolée, elle s'accompagne de façon constante d'un groupe de modifications. Les deux premières très importantes (perte de la pyocyanine et acquisition d'une certaine résistance à la lyse), les deux autres moins mesurables (couleur de la culture et odeur).

TABLEAU IV.

Type		Dissociation
Souche 608	lignée RV Pyo+	{ colonies RV Pyo+
	lignée Cl	colonies Cl colonies Cl
Souche 9649	lignée RV Pyo+	{ colonies RV Pyo+
	lignée Cl	colonies Cl colonies Cl
Souche 8437	lignée RV Pyo+	colonies RV Pyo+
	lignée Cl	colonies Cl
Souche 8619	lignée RV Pyo+	colonies RV Pyo+
	lignée Cl	colonies Cl
Souche 8913	lignée RV Pyo-	colonies RV Pyo-
	lignée Cl	colonies Cl

La souche 608 Cl apparue parmi les 608 RV est donc semblable à la souche claire isolée dès le début. Nous reproduisons dans le tableau IV quelques autres exemples de dissociation.

De nombreux auteurs ont provoqué des dissociations chez les *Pseudomonas*, sous l'influence de facteurs très divers : forte concentration du milieu en glycérol, présence d'anti-sérum (Gaby). Aussi, il nous a paru intéressant de signaler l'apparition spontanée, dès la sortie de l'organisme, d'une population microbienne mixte, constituée parfois de deux types extrêmement différents de *Pseudomonas*.

A l'examen de la figure 2 apparaît une conséquence notable de ce phénomène : c'est la transformation progressive de certaines souches abandonnées à elles-mêmes. Il est des cas, en effet (608, 9649), où la proportion des constituants RV et Cl se modifie. Les colonies foncées produisant les deux types alors que les colonies claires ont une descendance homogène, ces dernières ne tardent pas à dominer dans la population bactérienne.

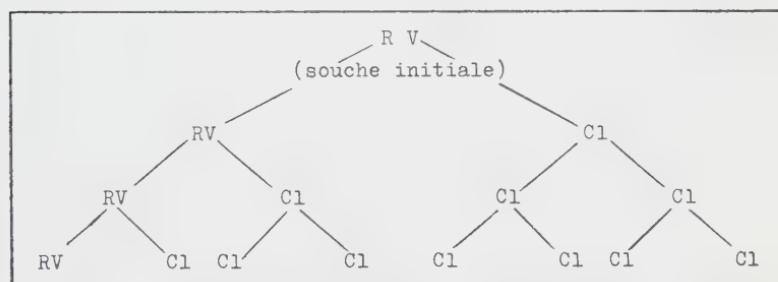


FIG. 2.

#### RÉSUMÉ.

Dix-huit souches de *Pseudomonas*, isolées sur milieu E. M. B. au sortir de l'organisme, ont présenté une dissociation spontanée en colonies rose vif (RV) et colonies claires (Cl). Les colonies RV produisent le plus souvent de la pyocyanine, présentent des plages de lyse spontanée, ont l'odeur caractéristique des *Pseudomonas*; les colonies Cl ne produisent jamais de pyocyanine, sont plus résistantes à l'autolyse, ont peu ou pas d'odeur. La sensibilité à la polymyxine est variable.

Les expériences décrites montrent : 1° Que chaque lignée RV et Cl est constituée de colonies ayant les mêmes caractères. 2° Que la dissociation se produit en dehors de l'action du milieu E. M. B. 3° Que la lignée claire reste pure tandis que la

lignée RV, dans certains cas, continue à se dissocier en RV et Cl ; si bien qu'on arrive en fin de compte à une forte prédominance Cl. Ce que d'autres auteurs ont appelé « dégénérescence » apparaît comme une variation dans le sens RV → Cl.

### SUMMARY

#### STUDIES ON SPONTANEOUS DISSOCIATION OF *Pseudomonas*.

Eighteen strains of *Pseudomonas* isolated from human beings, have been cultivated on E. M. B. medium.

On this medium, they spontaneously dissociate into bright pink (RV) colonies and clear colonies (Cl). RV colonies most often produce pyocyanin, present plaques of spontaneous lysis and have the characteristic smell of *Pseudomonas*. The Cl colonies never produce pyocyanin, are more resistant to autolysis, have little or no smell. The sensitivity to polymyxin is variable.

The experiments demonstrate :

1° That each line RV or Cl is constituted of colonies possessing the same properties.

2° That the dissociation is independent of the E. M. B. medium.

3° That the Cl line remains pure, whereas, in certain cases, the RV line continues to dissociate into RV and Cl colonies, so that there is finally a strong prevalence of Cl colonies. What other authors have called « degeneration » seems to be a variation RV → Cl.

### BIBLIOGRAPHIE

- BOURSE (R.). *Thèse de Médecine*, Toulouse, 1956.  
 ENGLESBERG et STAINER. *J. Bact.*, 1949, **58**, 171.  
 GABY (W. L.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 219.  
 HOLLOWAY (B. W.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **43**, 572.  
 MARCHAL (J. G.), SOLEIL (J.), GRANDJEAN-RADOWITCH (M<sup>me</sup>), BOTTE (J. M.).  
*Bull. Assoc. Dipl. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, 1956, n° 63, 1  
 POE (C. F.) et WHITE (B. J.). *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1953,  
**93**, 233.  
 SCHNABL (E.). *Wien. med. Wschr.*, 1952, **102**, 806.

# **RECHERCHES SUR LA MORPHOLOGIE DES LEPTOSPIRES A L'AIDE DU MICROSCOPE ELECTRONIQUE**

par A. A. VARPHOLOMEVA et E. S. STANISLAVSKY (\*)  
(présenté par M. van DEINSE).

*(Institut Metchnikov de Sérum et de Vaccins,  
Laboratoire des Leptospires, Moscou.)*

L'étude de la morphologie des Leptospires est loin d'être complète et, notamment, l'existence d'un fil axial dans les corps des Leptospires est restée, jusqu'à ces derniers temps, un sujet de controverse. Un certain nombre d'auteurs, Bermann, Zuelzer [1], Uhlengut et Fromme [2], Nikolaev [3], s'appuyant sur leurs études par l'ultra-microscope, concluent à la réalité de ce fil. D'autres, Noguchi [4], Varpholomeeva [5], n'ont pu le mettre en évidence bien qu'employant la même technique de recherches.

Ruska [6], Morton et Anderson [7], van Tiel et van Iterson [8] ont été les premiers à examiner les Leptospires par microscope électronique. L'imperfection des premiers microscopes électroniques semble être la cause du résultat négatif de leurs recherches.

Ce fut en 1948-1949 que Babudieri [9] a réussi à mettre en évidence, par le microscope électronique, non seulement un fil axial, mais encore de nombreuses autres structures morphologiques (granules, membranes) dans les Leptospires étudiés de cette façon. Par la suite, les résultats de Babudieri ont été confirmés par certains auteurs [10, 11, 12].

D'autres auteurs ont discerné, dans les corps des Leptospires, des formations se présentant comme des noeuds [13] ou bien des renflements ressemblant à des boutons [14]. Bessemans et ses collaborateurs ont réussi à isoler d'une culture de Leptospires d'eau (souche « Gent ») des granules à partir desquels ils ont obtenu, par ensemencements, une culture de ces mêmes Leptospires. D'autres auteurs ont réussi à mettre en évidence des granules de ce genre, soit par microscopie électronique, soit par microscopie à contraste de phase [16, 17]. Swain [12], Kavata et Aoye [19] ont décrit, chez les Leptospires, des formations ressemblant à des kystes.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 octobre 1957.

Nous avons, à notre tour, entrepris l'étude de la morphologie de *Leptospira ictero-hæmorrhagiae*, souche « Soudyin », de *L. pomona* (Monjakov), souche « Rat-223 », de *L. ballum*, souches « Mus 127 » et « Bratislava ». Nous nous sommes servis, pour cette étude, d'un microscope électronique de fabrication soviétique EM3.

#### TECHNIQUE DES RECHERCHES.

Pour obtenir des photographies présentant le moins possible d'artefacts, nous avons cultivé des Leptospires dans de l'eau distillée sans sérum ou ne contenant qu'une proportion très faible de sérum (0,05 ml pour 5 à 6 ml d'eau). Nous avons, d'autre part, évité de fixer les Leptospires par l'acide osmique avant de les examiner au microscope électronique.

Notre technique a donc été la suivante.

On prépare d'abord des grilles couvertes d'une pellicule de collodion : on prend un verre de laboratoire à fond plat qu'on remplit d'eau. Au fond, on place, sur des baguettes de verre, une lame de verre propre et dégraissée. Les grilles flambées au bec Bunsen sont posées sur la lame en demi cercle. Ensuite, on dépose sur la surface de l'eau I goutte d'une solution à 2 p. 100 de collodion dans l'acétate amyle qui, en s'étalant, forme bientôt une pellicule mince. A l'aide d'un siphon, on fait s'abaisser le niveau d'eau dans le verre et ainsi la pellicule de collodion se dépose sur les grilles et le verre. La lame de verre avec les grilles est alors déposée pour vingt-quatre heures dans un dessicateur. Une culture de Leptospires dans de l'eau distillée, âgée de 3 à 10 jours, est centrifugée pendant vingt-cinq à trente minutes à 8 000 t/m. On jette le surnageant et le dépôt contenant de très nombreuses Leptospires est dilué dans de l'eau distillée stérile ; on répète la centrifugation. Enfin, le culot, séparé du surnageant, est suspendu dans III à V gouttes d'eau distillée stérile, est examiné à l'ultra-microscope et déposé sur les pellicules de collodion préparées de la façon que nous venons de décrire. Quand la goutte de culture sur la pellicule de collodion est sèche, la préparation, métallisée à l'aide d'un alliage de nickel et de chrome, est examinée au microscope électronique.

Nous avons, ainsi, obtenu 300 photo-microographies dont quelques-unes sont reproduites avec ce mémoire.

#### RÉSULTAT DES RECHERCHES.

L'examen au microscope électronique montre que les Leptospires examinés atteignent une longueur de 18 à 20  $\mu$  ; quelques exemplaires peuvent atteindre une longueur plus élevée encore. Dans les cultures jeunes (3 à 4 jours) leurs dimensions peuvent

atteindre 5 à 10 microns. Le diamètre des Leptospires varie entre les limites de 0,09 et 0,15  $\mu$  et se trouve, le plus souvent, aux environs de 0,10  $\mu$ . Les deux extrémités sont plus minces (0,06 à 0,07  $\mu$ ). La boucle a une amplitude de 0,25 à 0,40  $\mu$ . Ces mesurations ont été effectuées sur préparation non métallisée afin de pouvoir déterminer les dimensions véritables des Leptospires.

L'étude des détails de structure nous a révélé l'existence d'un fil axial dans le corps des Leptospires, autour duquel le protoplasme s'enroule en spirale (pl. I, fig. 1). Dans le but de vérifier l'existence de ce fil axial, nous avons soumis les Leptospires à une lyse par un anti-sérum d'une part, et à une digestion tryptique d'autre part. Nous avons ainsi obtenu des images dont la figure 2 est un exemple, où on voit un fil axial libre dont un des bouts se trouve encore attaché à une spirale de protoplasme à moitié lysé. En étudiant, toujours au microscope électronique, des conglomérats lysés de Leptospires, nous avons pu voir de nombreux fils axiaux libres se projetant des amas lysés en forme d'araignée (fig. 3).

Nous avons constaté que la centrifugation provoque, chez les Leptospires, un détachement des fils axiaux qui se séparent des spirales de protoplasme. Les fils axiaux ainsi libérés forment des pelotons au bout des corps des Leptospires (pl. II, fig. 4). Le diamètre du fil axial atteint 200 à 300 Å. Dans les cultures jeunes (3 à 7 jours), nous avons pu constater la présence de Leptospires portant des formations caractéristiques au bout de leur corps (pl. II, fig. 5, 6 et 7). Il s'agit de formations sphériques ou ovaillaires dont le diamètre varie entre 2 à 10  $\mu$ ; elles se trouvent unies au corps du Leptospire par un fil minuscule dont le diamètre est de 0,02 à 0,03  $\mu$ . Chez certains exemplaires de Leptospires, nous avons constaté la présence de formations de ce genre à l'un et l'autre bout du corps et ces deux formations sphériques sont liées entre elles et à l'un et l'autre bout du corps du Leptospire par un fil tenu. A cause de leurs formes, nous les avons nommées « plaques ». Dans les cultures plus âgées, ces « plaques » sont ou bien absentes ou rares.

#### DISCUSSION.

Nous avons, par nos recherches, confirmé ce que plusieurs auteurs [9, 10, 11, 12] avaient déjà vu, à savoir : que le corps des Leptospires contient un fil axial autour duquel s'enroule le protoplasme sous forme de spirale à boucles serrées et régulières. Nous avons pu constater, en outre, que le fil axial résiste à la lyse alors que le protoplasme en spirale est presque entièrement lysé par un anti-sérum spécifique. Le fil axial résiste également

à l'activité de la trypsine, ce qui montre que sa composition est différente de celle de la spirale protoplasmique qui, elle, est attaquée par la trypsine. On peut donc admettre que les propriétés antigéniques et biochimiques du fil axial et du protoplasme ne sont pas les mêmes.

Nous sommes d'accord avec certains auteurs [10, 11] pour attribuer au fil axial les fonctions d'organe moteur. Dans les cas où ce fil se trouve raccourci, il provoque des mouvements de la spirale protoplasmique.

Les « plaques » que nous venons de décrire dans nos préparations observées en microscopie électronique, sont très probablement analogues aux renflements en forme de bouton que Uhlengut et Fromme ont observé sous l'ultra-microscope. Pour le moment, on ne sait pas encore si ces formations sont identiques aux « granules » vus par Jacob [16], Czekalowski et Eaves [17]. Des recherches ultérieures devront éclaircir ce problème.

On ne connaît pas encore la signification biologique des formations granulaires. Certains auteurs [16, 17, 18] considèrent ces « granules » comme représentant un stade du développement du cycle de vie des Leptospires. Bessemans, Woratz voudraient considérer ces « granules » comme représentant un stade de repos du microorganisme apparaissant quand les conditions de culture sont peu favorables. D'autres chercheurs encore [3, 9] les considèrent comme des signes de dégénérescence.

Nous croyons pouvoir déduire de nos recherches que les « plaques » que nous venons de décrire, font partie du processus de division des Leptospires.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons étudié la morphologie de *L. ictero-hæmorrhagiae* souche « Soudyin » ; *L. pomona* (Monjakow), souche « Rat-223 », *L. ballum*, souche « Mus 127 », à l'aide d'un microscope électronique de fabrication soviétique du type EM 3. Ces recherches nous ont permis d'établir que les Leptospires possèdent un fil axial autour duquel s'enroule le protoplasme en formant une spirale à boucles régulières. La longueur des Leptospires varie

#### PLANCHE I.

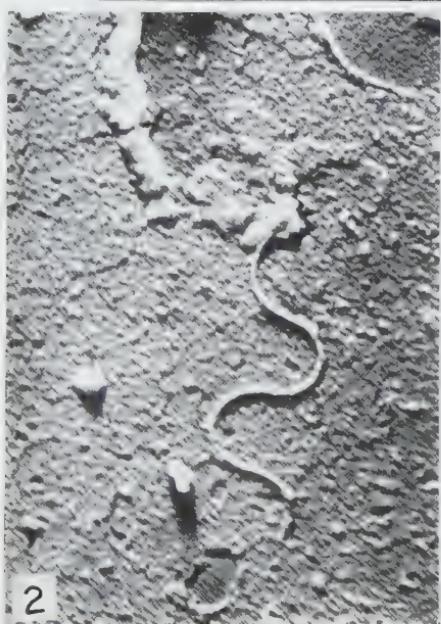
FIG. 1. — *L. ballum*, souche « Mus 127 ». Age de la culture : sept jours.  $\times 20\,000$ .

FIG. 2. — Fil axial, issu du photoplasme lysé. *L. pomona* Monjakow souche « Rat 223 ».  $\times 20\,000$ .

FIG. 3. — Phénomène d'agglutination et de lyse. Les fils axiaux libres se séparent de la masse du photoplasme lysé, de l'« araignée ». *L. icterohaemorrhagiae*, souche « Soudyin ».  $\times 20\,000$ .



1



2



3

PLANCHE I.



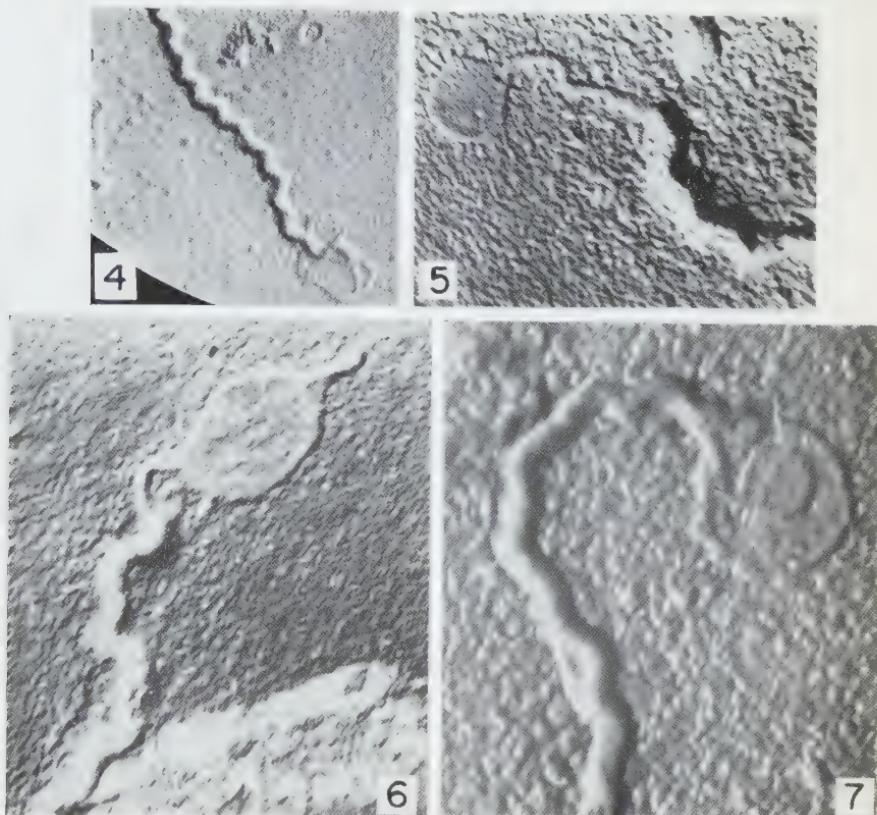


PLANCHE II.

FIG. 4. — Fili axial libéré enroulé à un bout, chez *L. ballum*, souche « Mus 127 ».  
Age de la culture : sept jours.  $\times 10\,000$ .

FIG. 5. — « Plaque » finale avec lien chez *L. icterohaemorragiae*, souche « Soudyin ». Age de la culture : trois jours.  $\times 20\,000$ .

FIG. 6. — « Plaque » finale avec lien chez *L. icterohaemorragiae*, souche « Soudyin ». Age de la culture : trois jours.  $\times 20\,000$ .

FIG. 7. — « Plaque » finale chez *L. icterohaemorragiae*, souche « Soudyin ».  
Age de la culture : sept jours.  $\times 20\,000$ .



entre 5 et 20  $\mu$  et au-dessus ; leur diamètre est de 0,09 à 0,15  $\mu$  ; l'amplitude de la boucle se trouve entre 0,25 et 0,40  $\mu$  ; le diamètre du fil axial ne dépasse pas 200 à 300 Å. Nous décrivons, dans cet article, certaines formations sphériques (« plaques ») se trouvant au bout des corps des Leptospires ou bien isolées dans les cultures jeunes (de moins d'une semaine). Les « plaques » sont reliées aux corps des Leptospires par un fil tenu. Le diamètre de ces « plaques » varie entre 2 et 10  $\mu$  et celui du fil tenu entre 0,02 et 0,03  $\mu$ . Il semble que ces « plaques » prennent part au processus de division des Leptospires.

### SUMMARY

#### ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON LEPTOSPIRA MORPHOLOGY.

The authors study the morphology of different *Leptospira* : *L. icterohemorragiae* « Soudyin » strain, *L. pomona* (Monjakow) « Rat-223 » strain, *L. ballum* « Mus 127 » strain. They demonstrate that the *Lepospira* possess an axial filament ; the protoplasm coils around this filament and forms a regular spiral. The length of the *Leptospira* ranges from 5 to 20  $\mu$  and more, their diameter is 0,09 to 0,15  $\mu$  ; the width of the spiral is 0,25 to 0,40  $\mu$ . The diameter of the axial filament never exceeds 200 to 300 Å. The authors describe certain spherical formations (plaques), which are seen at the extremity of the *Leptospira*, or isolated in young cultures. The plaques are linked to the *Leptospira* body by a thin filament. The diameter of these plaques ranges from 2 to 10  $\mu$  ; that of the filament, from 0,02 to 0,03  $\mu$ . The significance of these plaques is discussed.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERMAN (G.) et ZUELZER (M.). *Zbl. Bakt. Or.*, 1927-1928, **105**, 345-367.
- [2] UHLENUTH (P.) et FROMME (W.). *Berlin klin. Wschr.*, 1916, **53**, 269-273.
- [3] NIKOLAEV (I. I.). *Thèse*, 1951.
- [4] NOGUCHI (H.). *J. exp. Med.*, 1918, **27**, 575-592.
- [5] VARPHOLOMEVA (A. A.). *Maladies humaines provoquées par les leptospires M*, 1949.
- [6] RUSKA (cité d'après Babudieri).
- [7] MORTON (H. E.) et ANDERSON (T. E.). *J. Bact.*, 1943, **45**, 143-146.
- [8] VAN TIEL et VAN ITERSEN (Cité d'après VAN TIEL, *The Leptispiroses*, Leiden, 1948).
- [9] BABUDIERI (B.). *J. Hyg.*, 1949, **47**, 390-391.
- [10] MÖLBERT (E.). *Z. Hyg.*, 1955, **141**, 82-90.

- [41] CZEKALOWSKI (J. W.) et EAVES (G.). *J. Pathol. Bact.*, 1955, **69**, 129-132.
  - [42] SWAIN (R. H. A.). *J. Pathol. Bact.*, 1955, **69**, 117-128.
  - [43] HÜBENER et REITER [cité d'après VARPHOLOMEeva (A. A.)].
  - [44] UHLENGUTH et FROMME [cité d'après VARPHOLOMEeva (A. A.)].
  - [45] BESSEMANS (A.), WITTEBOLLE (P.) et BAERT (M. H.). *Zbl. Bakt. Ref.*, 1943, **143**, 297.
  - [46] JACOB (A.). *Klin. Wschr.*, 1949, **27**, 364-366.
  - [47] CZEKALOWSKI (J. W.) et EAVES (G.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 619-627.
  - [48] WORATZ (H.). *Zbl. Bakt.*, 1954, **160**, 613-628.
  - [49] KAVATA (T.) et AOYE (X.). *Japan J. Bact.*, 1956, **11**, 731-736.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 9 Janvier 1958

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## NÉCROLOGIE

### ACHILLE URBAIN

(1884-1957)

Un nouveau deuil frappe notre Société. Le Professeur Achille Urbain est mort au Val-de-Grâce le 5 décembre dernier après une longue et pénible maladie. C'était un bon pasteurien d'esprit et de formation, un bactériologue perspicace, un vétérinaire naturaliste de grande classe.

Né en 1884, il se dirigea dès qu'il eut terminé ses études secondaires vers la médecine vétérinaire militaire et sortit de l'Ecole nationale Vétérinaire de Lyon en 1907 pour servir aux armées ; mais son tempérament de chercheur le poussa en 1912 à faire, à Clermont-Ferrand, sa licence de sciences naturelles et à préparer une thèse de doctorat ès sciences. Celle-ci ne fut soutenue qu'en 1920 à la Sorbonne sur *L'influence des matières de réserve de la graine sur le développement des plantes phanérogames*, car entre temps il avait dû participer à la guerre de 1914-1918 comme vétérinaire d'un régiment d'artillerie et fut à ce titre décoré de la Croix de guerre.

Affecté en 1920 au Laboratoire Militaire de Recherches Vétérinaires il mène à partir de cette date une double carrière, car il devient pasteurien et ses recherches se dirigent plus spécialement vers l'étiologie, la bactériologie et la reproduction des maladies animales. Son séjour à l'Institut Pasteur fut des plus fructueux. Installé dans le groupe des laboratoires de Besredka, il ajouta à ses recherches bactériologiques, des recherches sérologiques et immunologiques (réaction d'Abderhalden, réaction de fixation, immunité locale et générale). C'est à cette époque qu'il met au point la vaccination du cheval par voie cutanée contre le charbon bactéridien, et commence avec Brocq-Rousseau et Forgeot ses recherches sur le streptocoque gourmeux. En

1927, il consacre sa thèse de doctorat vétérinaire à la réaction de fixation appliquée au diagnostic de certaines maladies microbiennes ou parasites communes à l'homme et aux animaux. Plus tard il appliquera cette réaction au diagnostic de la tuberculose (1938). C'est sa connaissance étendue de cette réaction qui l'a mené, entre autres découvertes, à la question des sensibilisatrices antimorveuses et antimalléiniques chez le cheval et le mulet, avec toutes ses applications pratiques.

En 1931, il fut nommé Sous-Directeur de la Ménagerie du Jardin des Plantes, et en 1934 Directeur du Parc Zoologique de Vincennes. C'est là qu'il donna la pleine mesure de son talent d'organisateur, et qu'il développa ses recherches sur l'éthologie des animaux sauvages. C'est ainsi qu'il fut nommé d'abord Professeur au Muséum, puis Directeur en 1941, et qu'il fit de cette maison, qui était déjà un des plus grands centres d'études naturalistes du monde, un modèle du genre.

Lieutenant-Colonel Vétérinaire de réserve, Commandeur de la Légion d'Honneur, membre de l'Académie nationale de Médecine, membre correspondant de l'Académie d'Agriculture, ancien Président de l'Académie vétérinaire, de la Société de Pathologie comparée, membre de la Société de Biologie il était depuis sa fondation membre de notre Société, et récemment il avait été mis en ligne dans la section d'Economie rurale de l'Académie des Sciences quand la maladie le surprit.

Son œuvre est considérable. Il n'est pas une espèce animale sauvage, ni une maladie vétérinaire qu'il n'ait étudiée : les salmonelloses, les brucelloses, les pasteurelloses, la morve, la mélioïdose, le charbon, la pseudo-tuberculose équine, la gourme, les streptococcies aviaires, le tétanos des animaux sauvages et domestiques, les tuberculoses animales, la gale du cheval, l'herpès, le choléra, les trichophyties, les mammites contagieuses, les paratyphoses, les gastro-entérites, la septicémie des poissons et de l'éléphant marin, le rouget du kangourou et du sanglier, la pleuropneumonie du singe, la septicémie des rongeurs, les helminthiases, la fièvre aphteuse, les aspergilloses aviaires, la leucopénie infectieuse des félins sauvages, la gangrène gazeuse des tortues géantes, etc. On comprend ainsi que son expérience lui valut d'être invité à rédiger avec Guillot le chapitre des bactéries pathogènes pour les animaux des deux éditions successives du *Dictionnaire des Bactéries*.

Au fichier de l'Institut Pasteur plus de 100 de ses communications sont référencées ; mais plus que l'organisation du Zoo de Vincennes, plus que son enseignement et que sa direction au Muséum, compteront, pour l'avenir, l'école et les disciples qu'il a formés.

Il a créé une école de bactério-clinique et de médecine expérimentale des animaux sauvages qui persistera. Enfin son traité de *Psychologie des animaux sauvages* ouvre la porte à des études naturalistes illimitées dans ce domaine.

Doit-on rappeler en terminant son amabilité toujours souriante, son extrême courtoisie qui effaçait les différences d'âge et de grade, l'excellent collègue qu'il fut ? Nous envoyons à sa famille nos plus vives condoléances et toute notre sympathie attristée.

A.-R. P.

## LES ACHROMOBACTER NITRATES-RÉDUCTEURS SANS ACTION SUR LES GLUCIDES ET LES PROTÉINES

par Jean BRISOU (\*).

(Institut Pasteur de Paris, Service des Anaérobies)

On a qualifié de noms variés [1] des bactéries à Gram négatif, mobiles, ciliées, aisées à cultiver, achromogènes, dont l'appartenance au genre *Achromobacter* est maintenant établie. De tels microbes furent isolés de l'eau, de fosses septiques, de coquillages, d'animaux, de divers produits pathologiques tels que bile, pus de sinus, pus d'uréthrites, etc.

La taxinomie des *Pseudomonadaceae* que nous avons récemment présentée [2] réserve un paragraphe aux *Achromobacter* non protéolytiques, réducteurs de nitrates en nitrites, dénués de pouvoir glucidolytique en milieu peptoné. Là sont rassemblées les espèces connues sous les noms de *sewerini*, *stutzeri*, *cycloclastes*, *agile*, *centropunctatum*, *denitrificans* et *dacunhae*. Toutes ces espèces, très voisines, peuvent être regroupées sans inconvénient majeur. La classification en sera plus aisée.

*Achromobacter sewerini* fut isolé en 1895 par Sewerin sous le nom de *Vibrio denitrificans* et décrit de nouveau sous le terme de *Bacillus denitrificans* la même année et de *Bacterium sewerini* en 1898.

*Achromobacter stutzeri* a fait en 1952 l'objet d'une étude signée de van Niel et Allen. Le premier spécimen du germe avait été isolé par Burri et Sturzer en 1895 qui l'appelèrent alors *Bacterium denitrificans II*. Les auteurs cités veulent en faire actuellement un *Pseudomonas* [3]. L'absence de pigment s'oppose formellement à cette conception. On signale que le germe croissant en anaérobiose dans un milieu contenant des nitrates, des nitrites ou du nitramide y provoque un dégagement gazeux. Il n'y a là rien qui puisse surprendre et qui puisse imposer le terme de *Pseudomonas*.

*Achromobacter cycloclastes* est le *Bacterium cycloclastes* de Gray et Thorton (1928).

*Achromobacter agile* est connu sous les noms de *Bacillus denitrificans agilis* que lui donnèrent Angola et Carino ou de *Bacillus denitrificans* de Chester.

*Achromobacter denitrificans* n'est autre que l'*Alcaligenes denitrificans* de Leifson et Hugh (1954).

Enfin, les espèces *centropunctatum*, *reticulare*, *dacunhae* ont été considérées tantôt comme des *Bacillus*, tantôt comme des *Bacterium* ou des *Pseudomonas*.

Il est bien certain qu'aucun de ces termes ne peut être admis.

(\*) Adresse de l'auteur : 15, rue Alsace-Lorraine, Poitiers (Vienne).

L'épithète *Bacillus* ou *Bacterium* s'applique à des bactéries à Gram positif ; les *Pseudomonas* sécrètent des pigments solubles imprégnant les milieux de culture de teintes allant du bleu au sépia, souvent fluorescents [2]. Les germes qui nous intéressent ici répondent à la définition des *Achromobacter*. Ils sont mobiles et rigoureusement achromogènes.

Les caractères que nous résumons dans un tableau montrent des similitudes telles entre ces microbes que l'on est conduit à envisager leur identité.

	Ni	Gel	Lait	Ind	H <sub>2</sub> S	Ci	Ur	Suc.	KCN
Ach. sewerini	+	-	-	-	-	d	-	-	+
" stutzeri	+	-	-	-	-	d	-	-	
" cycloclastes	+	-	-	-	-	-	-	-	
" agile	+	-	-	-	-	+	-	-	+
" denitrificans	+	-	Al	-	-	+	-	-	
" centropunctatum	+	-	Al	-	-	?	?	?	
" reticulare	+	-		-	-				
" dacunhae	+	-						-	

+: réaction toujours positive.

-: réaction toujours négative.

d : réaction variable.

Al : alcalinisation.

? : réaction inconnue.

Ni : nitrites.

Gel : gélatine.

Ind : indole.

Ci : citrate de soude (milieu de Kosel Simmons).

Ur : uréolyse en milieu synthétique.

KCN : épreuve de Braun en milieu peptoné au KCN.

Suc : sucres.

On est attiré en premier lieu par leur action énergique sur les nitrates. Cette propriété n'avait pas échappé aux observateurs qui, à plusieurs reprises, dotèrent ces germes du terme *denitrificans* appliqué à au moins quatre d'entre eux.

Par contre, nos microbes sont sans action sur les glucides et les protéines coagulées.

La réduction des nitrates en nitrites, NH<sub>3</sub> ou N<sub>2</sub> suffit dès l'abord à différencier ce groupe de bactéries de l'*Achromobacter alcaligenes* et de ses voisins. De fréquentes confusions furent cependant commises. Ne voit-on pas décrire le classique bacille de Petruschky comme attaquant irrégulièrement les nitrates ? En fait les souches authentiques sont sans action sur ce substrat. Les souches nitrates réductrices entrent dans le groupe que nous décrivons en ce moment. Il en résulte que l'*Achromobacter alcaligenes* est un germe très silencieux puisqu'il reste sans action sur les glucides, les nitrates et les pro-

téines. On peut le considérer comme le prototype des microbes Gram négatifs à caractères biochimiques négatifs.

Nous avons isolé les *Achromobacter* qui nous intéressent spécialement aujourd'hui d'eaux douces, d'eau de mer, d'eaux d'égoûts, d'huîtres, d'une urétrite et d'un crachat purulent. Leur ubiquité est donc évidente.

Tous ces microbes avaient le même aspect : bacilles assez courts avec quelques formes d'involution longues, mobiles, aisés à cultiver. Nous les avons purifiés par culture sur milieu de Kristensen servant à l'isolation des *Enterobacteriaceae*. Ces bactéries sont sans action sur la gélatine, même après quinze jours d'observation, aucun sucre courant n'est fermenté en milieu peptoné. Certaines souches cultivaient sur le citrate de soude en l'alcalinisant et faisaient virer le lait tournesolé au bleu. D'autres, sans action sur le citrate de soude en milieu de Koser-Simmons, laissaient le lait intact.

Tous ces germes donnaient rapidement une réaction des nitrites positive en eau peptonée nitratée. Une souche sur six se montra productrice d' $H_2S$  ; elle fut considérée comme une simple variété mineure. Aucune ne donna d'indole, n'hydrolysait l'urée en milieu de Ferguson-Hook, enfin la culture sur milieu de Braun au KCN était positive.

Pour simplifier l'identification de ces microbes dont il nous a encore été donné depuis quelque temps d'observer une dizaine de souches d'origine humaine, on peut proposer d'en retenir deux espèces que différencient leur comportement sur le citrate de soude en milieu de Koser-Simmons et le lait tournesolé. Les noms en seront respectivement :

*Achromobacter sewerini*, le plus ancien, pour les souches non alcalinisantes.

*Achromobacter agile*, pour les germes faisant virer dans la zone alcaline le lait tournesolé et le citrate de soude.

L'examen du tableau montre suffisamment que les espèces *sewerini*, *slutzeri* et *cycloclastes* sont très semblables. Il sera convenu que les souches alcalinisantes autrefois rangées parmi ces espèces passeront au second type : *Achromobacter agile*, auquel l'espèce *denitrificans* doit être identifiée.

Que fera-t-on des autres germes ? Il faut reconnaître que la description qu'on peut en lire dans les traités reste sommaire. On sait seulement que ces microbes sont nitrates réducteurs, inactifs sur les sucres et les protéines. Cela suffit pour les inclure dans le groupe *sewerini-agile*. Ils n'en seront que des variantes mineures. On réduit donc à deux espèces un groupe de bactéries très voisines décrites sous huit noms différents depuis plus de 50 ans. La description détaillée de souches récemment isolées confirmera cette façon d'envisager ce paragraphe de la systématique des *Achromobacter*.

Soulignons que de tels germes ne sont pas exceptionnels en médecine humaine.

**CONCLUSION.** — L'étude d'un certain nombre de souches de bacilles Gram négatifs non protéolytiques, non glucidolytiques, achromogènes, réducteurs de nitrates en nitrites, alcalinisant parfois le citrate de

soude et le lait tournesolé aboutit à la reconnaissance de deux types : *Achromobacter sewerini*, non alcalinisant et *Achromobacter agile* alcalinisant. Bon nombre de ces germes avaient été dénommés *denitrificans* en raison de leur action énergique sur les nitrates. Ce terme appliqué à plusieurs germes prêtait à confusion. Il est souligné que ces microbes ne sont pas rares en médecine.

#### SUMMARY

##### STUDY OF NITRATE REDUCING *Achromobacter* DEPRIVED OF ACTIVITY ON GLUCIDS AND PROTEINS.

The study of a certain number of Gram-negative, non proteolytic, non glucidolytic, achromogeneous, nitrate-reducing strains, which sometimes alcalinize sodium citrate, and litmus milk, demonstrates the existence of two types : *Achromobacter sewerini*, which is not alcalinizing, and *Achromobacter agile*, alcalinizing. Many of these germs had been called *denitrificans*, because of their strong activity on nitrates. This term, applied to several germs, was a cause of confusion. It is pointed out that these germs are not infrequent in human medicine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERGEY. *Manual of determinative Bacteriol.*, 7<sup>e</sup> édit., 1957.
- [2] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 93, 397.
- [3] NIEL (VAN) et ALLEN (J.). *J. Bact.*, 1952, 64, 413.

## ESSAI D'IMMUNISATION DU RAT BLANC CONTRE LA BRUCELLOSE

(DEUXIÈME NOTE),

par H. JACOTOT et A. VALLÉE

(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale)

Nous avons établi antérieurement que les suspensions de brucelles B. 19 tuées par l'acide phénique confèrent au rat blanc une immunité solide et de longue durée, ne le cédant en rien à la résistance consécutive à l'inoculation du même microbe vivant [1]. On trouvera dans la présente note les résultats d'expériences complémentaires sur le même sujet.

Ces expériences ont été conduites comme les précédentes sur des rats femelles pesant 110 g environ. Les injections de vaccin ont été

faites sous la peau et les inoculations de culture virulente pour les épreuves dans le péritoine. Les animaux ayant résisté à l'épreuve par inoculation de culture virulente ont été sacrifiés dans des délais qui seront indiqués ; leur autopsie n'a, le plus souvent, révélé aucune lésion ; quelques-uns présentaient une légère hypertrophie du foie ou de la rate ; la recherche de la brucelle d'épreuve a été faite dans ces deux organes. On verra que dans un certain nombre de cas ces ensements, désignés par la lettre E, ont été négatifs et l'on notera que lorsqu'ils étaient positifs la brucelle n'était généralement retrouvée que dans la rate.

**PREMIÈRE EXPÉRIENCE.** — Le vaccin vivant était constitué par une suspension de brucelles B. 19 contenant 10 milliards de microbes au centimètre cube ; il a été employé aux doses de 0,25 ou 1 cm<sup>3</sup>, représentant respectivement 2 milliards 500 millions et 10 milliards de brucelles. Le vaccin tué était constitué par une suspension de même souche, contenant 30 milliards de microbes au centimètre cube, stérilisée par addition d'acide phénique dans la proportion de 10 p. 1 000 ; cette suspension a été employée aux doses de 0,01 ou 0,05 cm<sup>3</sup>, représentant respectivement 300 millions et 1 milliard 500 millions de corps microbiens. Les épreuves ont été effectuées après deux mois et demi ou cinq mois, avec une brucelle de type *abortus*, chaque rat recevant par voie péritonéale 2 cm<sup>3</sup> d'un mélange à parties égales de culture microbienne et de mucine au 1/20, soit 10 milliards de microbes (tableau I).

TABLEAU I. — Essais comparatifs avec vaccin vivant et vaccin tué.

Épreuve après	Vaccin vivant		Vaccin tué		Témoin
	Dose = 1 cc.	Dose = 0,25 cc.	Dose = 0,05 cc.	Dose = 0,01 cc.	
2 mois 1/2		5 rats 1 meurt de brucellose dans les 24 heures; 4 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs		5 rats 5 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs	23 rats avec Br. <i>abortus</i> tous meurent de toxï-infection brucellique dans les 30 heures.
5 mois	5 rats 3 meurent de brucellose en 24 heures; 2 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs	6 rats 4 meurent de brucellose dans les 2 jours; 2 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs	6 rats 6 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs	6 rats 2 meurent de brucellose dans les 3 jours. 4 résistent; sacrifiés 3 mois après E : négatifs	

Cette première expérience apporte la confirmation des notions antérieurement établies ; il s'en dégage que la suspension phéniquée de brucelles B. 19 est fortement immunisante pour le rat blanc et le

protège mieux que ne le fait la suspension de brucelles vivantes contre une toxi-infection brucellique mortelle pour tous les témoins.

**DEUXIÈME EXPÉRIENCE.** — Elle a pour objet de comparer les effets des injections de vaccin phéniqué selon qu'on administre ce vaccin en un ou deux temps.

La suspension utilisée était la même que dans la première expérience ; elle a été administrée aux doses de 0,20, 0,10 et 0,05 cm<sup>3</sup> répétées à dix-sept jours d'intervalle, ou de 0,40, 0,20 et 0,10 en une seule injection ; les quantités injectées représentent respectivement 12 milliards, 6 milliards et 3 milliards de corps microbiens tués. Les épreuves ont été effectuées après un mois ou quatre mois avec une brucelle de type *melitensis*, selon le protocole indiqué plus haut (tableau II).

TABLEAU II. — Immunisation en un ou deux temps avec vaccin tué.

épreuve après	Immunisation en deux temps les 26.11 et 13.12 - Doses :			Immunisation en un temps le 10.12 - Doses :			Témoins
	0,20 x 2	0,10 x 2	0,05 x 2	0,40	0,20	0,10	
1 mois	9 rats 0 résist. sacrifiés	10 rats 10 résist. sacrifiés	10 rats 10 résist. sacrifiés	10 rats 10 résist. sacrifiés	10 rats 2 meurent après 3 mois	10 rats 3 meurent après 3 mois	10 rats avec <i>Pr. melitensis</i> meurent tous de brucellose dans les 2 jours
4 mois	8 rats 1 meurt de brucellose dans les 30 heures 7 résist. sacrifiés	8 rats 2 meurent de brucel- lose dans les 48 heures 6 résist. sacrifiés	3 rats 1 meurt de brucellose après 7 jours 7 résist. sacrifiés	10 rats 1 meurt après 1 mois E: posit.	8 rats 8 résist. sacrifiés 5 mois E: posit. E: 5 posit.	10 rats 3 meurent de brucel- lose au 7 <sup>me</sup> au 11 <sup>me</sup> J. 7 résist. sacrifiés 3 mois E: posit.	12 rats avec <i>Pr. melitensis</i> meurent tous de brucellose dans les 24 heures

Les résultats consignés dans ce tableau peuvent se résumer ainsi : *immunisation en deux temps* : tous les rats ont résisté à l'épreuve pratiquée un mois après la deuxième vaccination, ceux qui ont subi l'épreuve après quatre mois ont résisté dans la proportion de 6 ou 7 sur 8 ; *immunisation en un temps* : les rats qui avaient reçu la dose la plus forte de vaccin ont manifesté la même résistance que les rats immunisés en deux temps ; au contraire, ceux qui avaient reçu les doses les plus faibles se sont montrés, dans leur ensemble, moins bien protégés ; néanmoins, ceux qui n'ont pas pu surmonter l'épreuve sont morts avec un certain retard sur les témoins qui, tous, ont succombé en un ou deux jours. Il y a donc quelque avantage à pratiquer la vaccination en deux temps.

**TROISIÈME EXPÉRIENCE.** — On a utilisé la même suspension phéniquée que dans les expériences précédentes ; les rats ont été vaccinés en un temps aux doses respectives de 0,05, 0,01 et 0,001 cm<sup>3</sup>, représentant respectivement 1 milliard 500 millions, 300 millions et 30 millions de corps microbiens tués ; ceux du premier groupe ont reçu le vaccin brut, les autres des dilutions de ce vaccin en eau physiologique. Les épreuves ont été effectuées toujours selon le même protocole, après un mois avec une brucelle de type *melitensis* et après six mois avec une brucelle de type *abortus* (tableau III).

TABLEAU III. — Immunisation en un temps avec vaccin tué à faible dose.

Epreuve après	0.05 cc	5 cc au 1/100 = 0.05	1 cc au 1/100 = 0.01	0.10 cc au 1/100 = 0.001 cc	Témoins
1 mois	12 rats 12 résistent; sacrifiés 5 mois 1/2 après E : 6 positifs	12 rats 12 résistent; sacrifiés 5 mois 1/2 après E : 4 positifs	12 rats 2 meurent après 2 mois ? 10 résistent; sacrifiés 5 mois 1/2 après E : 6 positifs	12 rats 6 meurent de brucellose dont 5 dans les 2 jours; 6 résistent; sacrifiés 5 mois 1/2 après E : 1 positif	12 rats avec Fr. <i>melitensis</i> tous meurent dans les 24 heures
6 mois	11 rats 11 résistent; sacrifiés 4 mois après E : négatifs	11 rats 11 résistent; sacrifiés 4 mois après E : négatifs	7 rats 7 résistent; sacrifiés 4 mois après E : négatifs	12 rats 3 meurent de brucellose dans les 2 jours; 3 résistent; sacrifiés 4 mois après E : négatifs	11 rats avec Fr. <i>abortus</i> tous meurent dans les 2 jours

Les rats qui avaient reçu 0,05 cm<sup>3</sup>, sous forme de vaccin brut ou de vaccin dilué, ont parfaitement résisté aux deux épreuves échelonnées dans le temps ; ceux qui n'avaient reçu que 0,01 cm<sup>3</sup> ne se sont pas comportés très différemment ; au contraire, ceux qui avaient reçu 0,001 cm<sup>3</sup> sont morts dans la proportion de 6 sur 12, un mois après, et de 9 sur 12, six mois après la vaccination. Tous les témoins sont morts dans les vingt-quatre ou quarante-huit heures.

**CONCLUSION.** — L'injection au rat blanc d'une culture de brucelle B. 19 tuée par l'acide phénique confère à l'animal une forte et durable protection contre la toxi-infection brutale que provoque l'inoculation intrapéritonéale d'une culture virulente du type *abortus* ou du type *melitensis* mélangée à de la mucine. A cet égard, 300 millions de corps microbiens phéniqués immunisent mieux que 3 milliards de microbes vivants. Il apparaît que ni le microbe vivant, ni les corps microbiens tués n'exercent une influence décisive sur la stérilisation de l'organisme consécutivement à l'épreuve virulente ; la disparition des bru-

celles virulentes de la circulation est principalement due aux défenses naturelles du sujet ; elle s'opère dans des délais d'autant plus courts que le microbe employé à l'épreuve possédait un pouvoir pathogène moins prononcé.

#### SUMMARY

##### ATTEMPT OF IMMUNIZATION OF WHITE RATS AGAINST BRUCELLOSIS.

White rats injected with a phenol-killed *Brucella* B. 19 culture possess a strong and lasting immunity against intraperitoneal inoculation of a virulent *B. abortus* or *B. melitensis* culture + mucin. Three hundred millions phenolized bacteria produce a better immunity than three billions living germs. But neither living nor killed bacteria have a decisive influence on the sterilization of the animal, which appears following the challenge inoculation : the disappearance of living *Brucella* from the circulating blood is due above all to the natural defence mechanisms of the animal. The less pathogenic the germ used for challenge, the shorter the delay for the appearance of this sterilization.

#### BIBLIOGRAPHIE

JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 87, 152.

---

### A PROPOS DE TROIS COLIFORMES AYANT DES ANTIGÈNES COMMUNS AVEC *SHIGELLA SONNEI* EN PHASE II

par Danielle PIÉCHAUD et Szymona SZTURM-RUBINSTEN.

(*Instilut Pasteur, Service de Microbie générale et C. N. R. S.*)

Si la parenté antigénique et dans certains cas même l'identité de toutes les *Shigella* des groupes A, B, C avec des *Escherichia coli* est actuellement connue [1], le groupe D comprenant une seule espèce, *Shigella sonnei*, semble faire exception à la règle. On connaît cependant les rapports de la phase I de *Sh. sonnei* avec le coliforme C 27 [2] et *Pseudomonas shigelloides* de Bader [3] ; nous avons eu l'occasion d'observer ces dernières années trois souches de coliformes ayant des relations antigéniques avec la phase II. Si nous signalons ces observations, c'est que dans les trois cas le diagnostic de bactérie de Sonne a été envisagé ; c'est le problème pratique seul qui nous intéresse aujourd'hui.

La souche Mab. a été isolée en 1952 d'une coproculture : des selles solides avaient été envoyées du Service de M. Pasteur Vallery-Radot dans

notre laboratoire pour recherche de bacilles dysentériques ; c'est un bacille Gram-négatif qui n'utilise pas le lactose, est agglutiné immédiatement et avec clarification totale par le sérum anti-Sonne mixte et par le sérum anti-Sonne phase II, mais aucun autre caractère n'est celui d'une *Shigella* ; le germe est mobile et donne des gaz en glucose.

En avril 1956, le professeur Roux nous donne une souche isolée à Montpellier (souche Mont.) d'une bile et qu'on pense être un bacille de Sonne en raison de ses caractères antigéniques ; elle agglutine en effet parfaitement avec le sérum anti-Sonne mixte et avec celui préparé avec un Sonne en phase II ; cette souche, qui est immobile et qui n'est pas gazogène, acidifie le lactose rapidement et donne de l'indole en sept jours ; elle est mannite négative.

La troisième souche Val. a été isolée cette année en septembre à Valence par M. Meunier ; notre collègue Le Minor, qui l'avait reçue au Service des Vaccins, nous l'a transmise. Cette souche qui acidifie tardivement (en quatre jours) le lactose, agglutine, elle aussi, immédiatement en présence de sérum anti-Sonne en phase II, mais elle est indole + en vingt-quatre heures et fermente le glucose en produisant des gaz.

En 1945, Wheeler et Mickle [4] ont décrit la souche Harris, qu'ils appellent *paradysenteriae* ; nous devons à l'amabilité du Dr E. K. Bornmann d'avoir cette souche, qui est en effet proche des dysentériques par ses caractères biochimiques ; elle diffère cependant de *Sh. sonnei* parce qu'elle est indole +.

Nous ne saurions donc rapprocher de « Harris » nos souches Mab., Mont. et Val. qui ne sauraient être considérées biochimiquement comme des bacilles dysentériques.

Sérum		
Souches	Sonne en phase II, Kas.	Mont.
Sonne en phase II, Kas.	1/3200	1/6400
Sonne en phase I, Clu.		0
Mont.	1/3200	1/3200
Val.	1/3200	1/6400
Mab.	0	0

Cette dissociation entre les caractères biochimiques et sérologiques pour nos trois souches est assez évidente pour qu'on ne puisse les classer avec les bacilles dysentériques ; mais l'étude des caractères sérologiques s'est répandue plus récemment que celle de la biochimie, et on a pris l'habitude de lui accorder une importance primordiale. Cette importance est indiscutable, mais les caractères morphologiques, culturaux et biochimiques doivent tout d'abord avoir situé le germe dans un groupe de bactéries, où ensuite l'étude antigénique donnera

le sérotype du germe. On connaît des parentés antigéniques entre des espèces très éloignées que rien d'autre ne permet de rapprocher.

Nous avons repris l'étude de ces souches récemment ; la plus ancienne d'entre elles avait perdu toute parenté avec le bacille de Sonne. Les antigènes qui permettent de rapprocher ainsi des souches tout à fait hétérogènes auraient donc dans certains cas un aspect transitoire. Les deux autres souches, au contraire, sont toujours agglutinables.

**CONCLUSION.** — Le bacille de Sonne est un germe qu'on isole très fréquemment à l'heure actuelle, plus qu'autrefois semble-t-il, bien que dès son origine son rôle dans de multiples épidémies ait été reconnu. Certains critères en permettent aisément le diagnostic : il est immobile, ses cultures se dissocient habituellement en deux types de colonies, il ne fermente pas le lactose rapidement, il ne donne pas de gaz, il est indole négatif.

Deux critères plus récents semblent aussi constants : la réaction d'Alessandro et Comes [5] sur gélose à l'acide phényl-propionique [6], que nous n'avons jamais trouvé positive pour les Entérobactéries ayant des antigènes communs avec *Shigella sonnei* et qui l'est presque toujours pour le bacille de Sonne [7] ; l'alcalinisation du milieu au citrate de Christensen [4], qui n'est jamais constatée pour les *Shigella*. Le premier de ces tests était négatif et le deuxième positif pour les trois souches que nous avons observées. Si la souche Harris a une réaction d'Alessandro négative (comme d'ailleurs certains dysentériques), elle n'alcalinise pas le milieu au citrate de Christensen, ce qui la rapproche des *Shigella*.

**RÉSUMÉ.** — Trois souches de *paracoli* ayant des antigènes communs avec *Sh. sonnei* en phase II sont décrites. L'importance des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques pour le diagnostic d'un germe est soulignée. Quelques caractères importants pour le bacille de Sonne sont mis en relief.

#### SUMMARY

#### STUDY OF THREE *B. coliforme* POSSESSING ANTIGENS IN COMMON WITH *Shigella sonnei* PHASE II.

Description of three strains of *paracoli* possessing antigens in common with *Shigella sonnei* phase II. The importance of morphological, cultural and biochemical properties for the diagnosis of a germ is pointed out. Certain important characters of *Sh. sonnei* are described.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] EDWARDS (P. R.) et EWING (W. H.). *Identification of Enterobacteriaceae* Burgess, édit., Minneapolis, 1955.
- [2] FERGUSSON (W. W.) et HENDERSON (N. D.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 179.
- [3] BADER (R. E.). *Z. Hyg.*, 1954, **140**, 450.
- [4] WHEELER (K. M.) et MICKLE (F. L.). *J. Immunol.*, 1945, **51**, 257.
- [5] ALESSANDRO (G. D') et COMES (R.). *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1952, **31**, 291.
- [6] BORTOLINI (G.) et CAPOCACCIA (L.). *Arch. ital. Sci. med. trop.*, 1957, **38**, 257.
- [7] SZTURM-RUBINSTEIN (S.) et PIECHAUD (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 589.

**LE VIRUS DE L'AVORTEMENT DE LA BREBIS.  
SON POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE NÉVRAXE.  
SA PARENTÉ  
AVEC LE VIRUS LYMPHOGRANULOMATEUX**

par Francis ROGER et Annie ROGER.

(Institut Pasteur, Service des Rickettsies  
[Dr Paul GIROUD])

Nous avons isolé le virus de l'avortement de la brebis, pour la première fois en France, en 1956, et nous avons rapporté alors les principales caractéristiques du pouvoir pathogène expérimental d'une des souches que nous avions obtenue (dite souche « Compiègne 56 ») [1]. Depuis cette date, nous avons eu l'occasion de rencontrer et d'isoler de nombreuses autres souches de comportement très homogène.

Deux faits, en particulier, nous ont semblé toujours remarquables lors de l'étude de ces souches sur les animaux de laboratoire : d'une part, leur comportement chez la souris inoculée par voie péritonale ; d'autre part, les résultats de l'inoculation dans le sac allantoïque.

*Les souris* survivent généralement de façon indéfinie à l'inoculation péritonale et c'est seulement chez un très petit nombre d'animaux sacrifiés systématiquement qu'il est possible de rencontrer le virus dans les frottis de rate entre le dixième et le quinzième jour.

*Les œufs* inoculés dans le sac allantoïque (au huitième jour) avec des doses massives de virus meurent entre le deuxième et le douzième jour de l'inoculation, mais sans que la culture puisse être régulièrement obtenue : 1 œuf sur 10 en moyenne montre des corps élémentaires ou polymorphes, mais on ne trouve que rarement des corps élémentaires (d'une extraordinaire finesse) à l'intérieur du liquide allantoïque lui-même.

Ces deux caractères sont extrêmement importants pour la position systématique du virus à l'intérieur du grand groupe des virus visibles (groupe lymphogranulomatose-psittacose-trachome) : ils rapprochent singulièrement le virus de l'avortement de la brebis de celui de la lymphogranulomatose et l'éloignent, au contraire, nettement du virus de la psittacose. Celui-ci cultive, en effet, intensément dans le sac allantoïque de l'œuf et tue précocement la souris inoculée par voie péritonale. Nous nous sommes donc demandé si le virus de l'avortement n'appartenait pas au sous-groupe lymphogranulomatose.

Or, on sait que le virus de la maladie de Nicolas et Favre a un pouvoir pathogène évident pour le névraxe. Nous avons donc décidé d'examiner aussi le pouvoir pathogène du virus brebis pour le système nerveux. Nous avons eu recours, comme on l'a fait depuis longtemps

pour la lymphogranulomatose, à l'inoculation intracranienne chez la souris et le singe et nous voulons rapporter ici le résultat des observations effectuées entre octobre 1956 et mai 1957 avec la souche « Compiègne 56 », obtenue par culture dans le sac vitellin.

**1<sup>o</sup> INOCULATION A LA SOURIS.** — Les membranes vitellines infectées ont été broyées au broyeur de verre en présence de sable de Fontainebleau stérile, mises en suspension dans le liquide conservateur de Bovarnick et inoculées alors à la souris (sous le volume de 0,01 cm<sup>3</sup>) à raison de 1/250 de membrane par souris (titre infectant limite des membranes dans le sac vitellin : 10<sup>-9</sup>).

Après désinfection cutanée à l'alcool iodé, l'inoculation a été pratiquée avec un appareil que nous avons fait fabriquer et qui permet d'effectuer l'injection à l'intérieur de l'arachnoïde aussitôt après avoir traversé le pariétal.

Le fait « clinique » le plus caractéristique a été *l'étalement de la mortalité* malgré l'importance des doses inoculées, certains de nos animaux ayant survécu plus de trois semaines.

A l'autopsie des animaux morts, et quelle qu'ait été la date de la mort, nous avons pu chaque fois mettre en évidence le virus sur des frottis d'arachnoïde, effectués par apposition après ouverture de la boîte crânienne. Le virus existait ordinairement sous ses trois aspects morphologiques caractéristiques : les corps élémentaires, les corps initiaux et les corps polymorphes. Il était coloré soit en rouge, soit en bleu au Macchiavello, en violet au Giemsa. On le rencontrait soit sous forme d'éléments isolés, soit en colonies tout à fait caractéristiques, à l'état libre ou à l'intérieur des cellules.

Des contrôles histologiques ont été effectués par J. Levaditi : leurs résultats feront l'objet d'une communication ultérieure.

**2<sup>o</sup> COMPORTEMENT DES SINGES.** — Le mode de préparation des suspensions a été en tous points identique à celui utilisé pour les souris, mais la purification du virus a été beaucoup plus grande : nous n'avons en effet utilisé que des suspensions de corps élémentaires obtenues par centrifugation différentielle.

L'inoculation a été pratiquée selon le procédé classique, au niveau du lobe frontal, après perforation osseuse au trépan de Besredka. La dose inoculée (sous le volume de 0,25 cm<sup>3</sup>) était considérable puisqu'elle correspondait à l'équivalent virulent d'une demi-membrane vitelline (infectante à 10<sup>-9</sup>) par animal.

Nous avons ainsi inoculé deux singes *Papio sphynx hamadrias*.

**OBSERVATION DU SINGE I.** — A la vingt-quatrième heure, la température est à 36°7, le singe est peu actif mais nettement conscient et suit du regard tous les déplacements de l'observateur. Les extrémités sont le siège d'une *contracture* permanente en flexion assez intense pour que l'animal ne puisse saisir ni un morceau de bois qu'on lui tend ni les barreaux de sa cage. Les membres sont également repliés en flexion mais la contracture y est moindre qu'aux extrémités.

Si on excite l'animal, son *tuphos* se manifeste par le peu d'enthousiasme de ses réponses. Les déplacements de ses membres mettent en évidence un

*tremblement intentionnel avec incoordination* (il manque les objets qu'il veut saisir) mais sans aucune disparition de la contracture manuelle.

Après quelques efforts, l'animal dont la *faiblesse* est intense, se couche sur le côté et refuse désormais de réagir à toute nouvelle excitation ; en même temps apparaît un *tremblement* considérable et généralisé, susceptible de persister une dizaine de minutes après l'effort, et prédominant aux membres inférieurs.

Il n'y a pas de raideur de la nuque, pas de tremblement ni d'incoordination ou de faiblesse musculaire au niveau de l'extrémité céphalique.

La mort est survenue à la quarante-huitième heure.

OBSERVATION DU SINGE II. — *A la vingt-quatrième heure*, la température est à 35°5, le singe est couché sur le côté, immobile et ne répond plus aux sollicitations extérieures. Par moments, les membres et la tête sont sujets à des *mouvements lents* de moyenne amplitude. Les yeux sont ouverts et on y constate aussi des *mouvements lents de latéralité*, sans véritable nystagmus.

Les mains du singe sont *contracturées* en flexion et les muscles des membres sont soumis à des *soubresauts* plus ou moins irréguliers dans le temps et qui les frappent isolément. Il n'y a pas de raideur de la nuque.

*A la quarante-huitième heure*, l'animal est toujours couché sur le côté, sa température est à 37°2 C. Les *contractures* sont généralisées et les membres sont immobilisés en flexion.

Les yeux sont ouverts avec des pupilles *mydriatiques* ; on observe à leur niveau un *nystagmus vertical* dont le mouvement lent s'effectue de haut en bas.

L'ensemble des muscles du corps est soumis à un *tremblement continu*, spontané : les *secousses musculaires* sont remarquables, surtout au niveau des membres.

*Toute excitation provoque aussitôt une augmentation considérable et généralisée des contractures.*

La mort se produit au troisième jour.

COMPTE RENDU DES AUTOPSIES. — Chez les deux singes, on constate une congestion intense des vaisseaux méninx dans tout le névraxie mais avec une prédominance cérébrale marquée.

En regard du point d'inoculation, le lobe frontal du singe I présente une zone d'aspect anormal, qui rappelle un infarcissement hémorragique.

Le liquide céphalo-rachidien est trouble et on y constate la signature habituelle biologique des infections aiguës à virus du groupe de la psittacose (au sens large du mot) : la présence de très nombreux polynucléaires. Il y a, bien entendu, aussi des monocytes et des cellules macrophagiques mais leur nombre est cependant moindre que celui des polynucléaires. C'est pourtant dans les cellules mononucléées que l'on retrouve les inclusions virales les plus typiques.

Les autres organes sont normaux.

RECHERCHE DU VIRUS DANS LES FROTTIS. — Les frottis effectués en dehors du système nerveux (foie, rate, poumons, reins, pancréas, etc.) ne contiennent pas de virus directement visible.

En revanche, il nous a été facile de retrouver le virus au niveau de l'arachnoïde par une technique analogue à celle utilisée chez la souris

et, principalement, au niveau de la convexité cérébrale. Les figures intracellulaires de multiplication du virus (voir fig. 1) sont très belles et on y retrouve le polymorphisme habituel de la souche « Compiègne 56 ». Il existe beaucoup de granulations virales à l'état libre, soit isolées, soit en globi.

Au Macchiavello, les éléments virulents sont rouges ou bleus, d'autant plus rouges, généralement, qu'ils sont plus fins. Au Giemsa, la richesse de la culture paraît encore plus grande et les corps polymorphes (en anneau, en bacilles bipolaires, etc.) sont particulièrement nombreux.

Chez le singe I, nous avons trouvé le virus non seulement dans les frottis d'arachnoïde mais encore dans les frottis de capillaires cérébraux

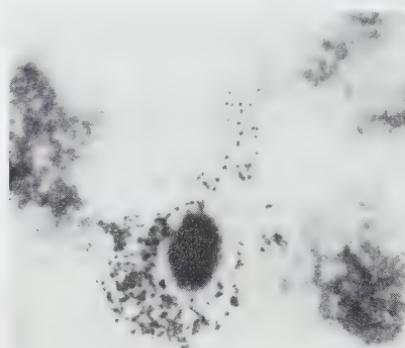


FIG. 1. — Gr.  $\times 1\,200$ . Color. bleu de méthylène, bicarbonate isotonique. (Service photographique de l'Institut Pasteur. Chef de Service : P. Manigault).

avec la coloration de Macchiavello : il y avait, en effet, des corpuscules virulents dans les cellules endothéliales et ils se présentaient comme des corps arrondis de 300 à 400  $\mu$ , faiblement colorés en rouge rubis et tout à fait analogues à ceux que nous avons observés chez les brebis au cours des éliminations prolongées de virus au niveau du col (après la mise bas).

Des coupes histologiques ont été faites dans le service d'anatomopathologie du Dr J. Levaditi : leurs résultats seront rapportés ultérieurement.

*En résumé*, le virus de l'avortement de la brebis montre pour le névraxe une affinité non douteuse : son pouvoir pathogène se rapproche nettement de celui des souches classiques de lymphogranulomatose, aussi bien chez la souris que chez le singe.

La souris, de beaucoup la plus résistante après inoculation arachnoïdienne, présente, en effet, une affection chronique prolongée même

avec de très fortes doses de virus, affection souvent remarquablement tolérée mais pendant laquelle la culture, très lente, ne cesse pourtant pas de progresser.

Le singe, avec les quantités considérables que nous avons employées (comme il l'aurait fait avec des quantités équivalentes du virus lymphogranulomateux), a présenté une maladie suraiguë, volontiers hypothermante, où les symptômes méningés allaient de pair avec des signes d'irritation des noyaux de la base et du cervelet. L'évolution très rapide de l'affection a cependant permis de constater une abondante culture arachnoïdienne.

#### SUMMARY

##### THE VIRUS OF SHEEP ABORTION.

ITS PATHOGENICITY FOR THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.

ITS RELATIONSHIPS WITH THE LYMPHOGRANULOMA VIRUS.

The virus of sheep abortion possesses a marked affinity for the central nervous system. Its pathogenicity in mice as in monkeys is similar to that of the classical strains of lymphogranuloma virus.

Mice are much more resistant than monkeys. After inoculation into the arachnoid, they present a prolonged chronic disease, even when very high doses of virus are used. Although this disease is often very well tolerated, a very slow multiplication of the parasite takes place.

Monkeys inoculated with considerable doses of sheep abortion virus present an exceptionally acute, often hypothermic disease ; the meningeal symptoms are accompanied by symptoms of irritation of the nuclei of the basal region of the brain and cerebellum. Although the course of the disease was very rapid, it was possible to demonstrate an abundant multiplication in the arachnoid.

#### BIBLIOGRAPHIE

GIROUD (P.), ROGER (R.), VALLÉE (A.) et ROGER (A.). *Bull. Acad. vét.*, 1956,  
29, 393-401.

## LE SÉRUM ANTIRABIQUE DANS LE TRAITEMENT DES MORSURES DE LA FACE AU NORD-VIETNAM

par M. BARME.

*(Institut Pasteur de Saigon)*

Les morsures de la face par chiens enragés présentent, au Nord-Vietnam, une gravité particulière liée sans doute à la brièveté de l'incubation de la rage dans cette région.

Dans une statistique s'étendant sur quarante années, Dodero [1] relève, dans 41 p. 100 des cas de rage survenus après des morsures de sièges variés, une incubation inférieure à un mois. Bablet et Joyeux [2] ont noté, sur 58 cas, 56 p. 100 d'incubations d'une durée inférieure à vingt-cinq jours.

L'inoculation au lapin met encore en évidence la virulence élevée de ces souches de virus des rues : plus de la moitié des 74 souches étudiées par Bablet et Joyeux [2] donnaient une incubation inférieure à quatorze jours. Bablet et Marneffe [3] ont isolé chez un homme mort de rage une souche paralysant le lapin en cinq jours.

Le vaccin phéniqué, dans ces conditions, est totalement inefficace chez les mordus à la face, même si le traitement a été commencé à doses renforcées aussitôt après la morsure ; il n'empêche pas l'apparition de la rage après une incubation qui paraît encore raccourcie sous son influence puisqu'elle ne dépasse pas dix jours dans certains cas.

La sévérité de ce pronostic contraste avec les résultats obtenus à l'Institut Pasteur de Hanoï chez les personnes mordues en d'autres régions du corps : au cours des années 1955 et 1956, aucun cas de rage n'a été constaté chez plus de 6 000 personnes prises en traitement après avoir été mordues par des chiens enragés ou suspects de rage.

Aussi, dès la fin de 1955, un traitement complémentaire a été administré aux mordus de la face, d'abord avec un sérum antirabique brut préparé localement [4], puis avec un sérum purifié et concentré fourni par l'Institut Pasteur de Paris et dû à l'obligeance du Dr P. Lépine.

Les trois observations suivantes sont choisies pour illustrer les étapes de cet essai thérapeutique.

1<sup>o</sup> *Vaccin phéniqué seul* (vaccin type Semple). — Ngo-van-S..., 6 ans, est mordu le 30 septembre 1955 par un chien furieux qui a été abattu aussitôt. Présenté à la consultation le 1<sup>er</sup> octobre, il porte des blessures légères au niveau du front. La vaccination est mise en œuvre aussitôt, à raison de deux injections de 5 ml par jour les cinq premiers jours, puis d'une injection quotidienne les jours suivants. Dans la nuit du 10 au 11 octobre, soit après une incubation de dix jours et demi, les premiers signes de rage apparaissent et l'enfant meurt le 11 octobre à minuit.

2<sup>e</sup> *Sérum brut associé au vaccin phéniqué.* — Nguyen-Thi-L..., 35 ans, a été mordue le 24 mai 1956 et vient le jour même à l'Institut Pasteur en apportant la tête du chien. Elle présente au niveau du menton une plaie large et profonde, et de multiples traces de dents à la poitrine, au mollet et à la cuisse. L'examen du cerveau du chien montre la présence de corps de Negri et l'inoculation à un lapin fut par la suite positive, avec paralysies et corps de Negri. La blessée reçoit le 24 mai 40 ml de sérum antirabique brut avec 150 unités R. T. de hyaluronidase, puis 22 injections de 5 ml de vaccin phéniqué pendant les dix-sept jours suivants.

C'est seulement le 3 juillet que son mari vient annoncer qu'elle présentait depuis la veille des crises d'aérophobie ne laissant aucun doute sur l'issue fatale qu'on pouvait en attendre.

On peut constater ici un allongement important de la période d'incubation jusqu'à quarante jours, particulièrement digne de remarque si l'on tient compte de la gravité des morsures.

3<sup>e</sup> *Sérum purifié et concentré associé au vaccin phéniqué.* — Vu-Thi-H...Q..., 4 ans, est attaquée le 15 septembre 1956 par un chien furieux, aussitôt abattu. Ses parents l'amènent le jour même à l'Institut Pasteur, en apportant la tête du chien. L'examen histologique montre la présence de corps de Negri, et, par la suite, un lapin inoculé mourut paralysé le treizième jour, avec également des corps de Negri.

L'enfant porte à la poitrine de nombreuses plaies peu profondes, mais aussi une blessure profonde au front et un arrachement, sur environ 4 cm d'une arcade sourcilière. On lui administre aussitôt, le jour de la morsure, 20 ml de sérum concentré, puis, les jours suivants, le vaccin phéniqué jusqu'au total de vingt-trois injections de 5 ml en dix-huit jours.

La petite blessée est revue le 1<sup>er</sup> décembre, soit deux mois et demi après sa morsure, en parfaite santé. Ses parents nous apprennent alors qu'une femme de 47 ans avait été mordue au sein le 14 septembre par le même chien ; malgré un traitement de vingt et une injections de vaccin administrées par l'infirmérie de son village, cette femme est morte le 21 octobre après quatre jours d'une maladie dont les symptômes décrits sont ceux d'une rage, affection bien connue des Vietnamiens.

Le sérum brut ne semble donc pas avoir d'autre effet que d'allonger la période d'incubation ; sa teneur en anticorps était sans doute trop faible pour pouvoir prévenir l'apparition de la rage.

Le sérum purifié et concentré a permis d'observer les premiers cas de protection totale ; à partir de juin 1956, il fut administré systématiquement aux personnes mordues à la face. Et, alors que le diagnostic de rage chez les chiens mordeurs pouvait être établi par les tests de laboratoire, ou considéré comme très probable d'après les symptômes décrits ou les circonstances de la morsure, aucun cas de rage n'a été constaté chez 24 blessés ainsi traités.

**RÉSUMÉ.** — L'existence, au Nord-Vietnam, de souches de virus rabique des rues d'un type décrit sous le nom de « virus renforcé » en raison de sa virulence exceptionnelle donne aux morsures de la face par des chiens enragés une gravité particulière.

Dans aucun de tels cas, le vaccin phéniqué n'empêche l'apparition de la rage. Il semble même raccourcir la période d'incubation.

L'adjonction au vaccin d'un sérum antirabique brut préparé localement n'a pas eu d'autre effet que d'allonger notamment l'incubation.

Le sérum purifié et concentré de l'Institut Pasteur de Paris a permis l'observation des premiers cas de protection totale.

## SUMMARY

ANTIRABIC SERUM IN THE TREATMENT OF BITES OF THE FACE  
IN NORTH-VIETNAM.

There exists in North-Vietnam strains of « reinforced » street rabies virus, so called because of their exceptional virulence. Bites of the face by animals infected with such strains are particularly severe.

In these cases, phenol vaccine never prevents rabies. It seems even to shorten the incubation period.

The addition to phenol vaccines of a raw local antirabic serum has no other effect than a marked prolongation of the incubation period.

The purified and concentrated serum prepared in the Paris Pasteur Institute has allowed to observe the first cases of total protection.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DODERO (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 193.
- [2] BABLET (J.) et JOYEUX (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **44**, 141.
- [3] BABLET (J.) et MARNEFFE (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, **48**, 301.
- [4] KIRSCHÉ (P.) et BARME (M.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1956, **49**, 21.

## LA RECHERCHE DU BACTÉRIOPHAGE DANS LES EAUX PAR LA TECHNIQUE AU CHLOROFORME

par P. MONNET, M<sup>me</sup> H. LE TELLIER et A. DREVON (\*).

(Institut Pasteur, Lyon)

Depuis fin 1953, est utilisée, au Laboratoire d'Hygiène Appliquée de l'Institut Pasteur de Lyon, la technique au chloroforme suivant la méthode de Frédéricq pour la recherche des bactériophages fécaux dans les eaux.

La souche réceptive est un *Shigella paradyserteriae* qui nous fut aimablement communiqué par le Dr Buttiaux, les *Shigella* étant, on le sait, des germes très sensibles aux bactériophages fécaux.

TECHNIQUE (1). — La veille, à 12 heures, le *Sh. paradyserteriae* estensemencé sur un tube d'eau peptonée ordinaire, et parallèlement sur gélose profonde pour conservation au réfrigérateur.

(\*) Communication présentée au XXXVI<sup>e</sup> Congrès d'Hygiène, Paris, 28-29 octobre 1957.

(1) Abréviations utilisées : E. coli = *Escherichia coli*, Cl. p. = *Clostridium perfringens*, S. F. = *Streptococcus faecalis*. C. = Chloroforme (méthode au). F. = Filtration (méthode de).

A 18 heures, un Erlenmeyer contenant : eau à analyser, eau peptonée spéciale aa 50 ml, estensemencé avec XX gouttes de la culture précédente, incubation à 37°.

A 18 heures, ensemencement de 1 à 4 tubes d'eau peptonée avec le *Sh. paradysenteriae*. Incubation à 37°.

Le jour de l'épreuve, à 8 heures, on prélève dans un tube stérile 10 ml de l'Erlenmeyer. On adjoint VIII gouttes de chloroforme. On agite énergiquement. On laisse reposer trente minutes à l'abri de la lumière (2).

La gélose spéciale en boîte de Petri est alors ensemencée avec IV gouttes de la culture en eau peptonée de la veille au soir. L'étalage doit être uniforme. On laisse sécher jusqu'à imbibition totale (moyenne, vingt minutes).

On dépose sur la boîte I goutte, prélevée à l'ose, de la partie surnageante claire du tube chloroformé. Il importe grandement que le prélèvement soit effectué à la partie tout à fait supérieure.

On recouvre d'un carton renversé. On laisse sécher vingt à trente minutes. On retourne et on incube à 37°.

La lecture s'effectue six heures plus tard.

RÉSULTATS. — + + + = lyse confluente, plage entièrement claire ; bactériophage très actif.

+ + = plages claires, semi-confluentes, réalisant un contour extérieur déchiqueté ; nombreux éléments bactériophagiques.

+ = petites zones claires que l'on doit soigneusement distinguer d'un mauvais étalement de la culture par leurs bords très nets et leur absence dans la partie non inoculée ; présence de rares éléments bactériophagiques.

La présence éventuelle de mutants est indiquée.

La gélose spéciale utilisée est à 5 g de NaCl et 15 g d'agar par litre. L'eau peptonée spéciale, à 6 g de NaCl et 60 g de peptone.

Plus de 10 000 recherches ont été ainsi effectuées, la plupart dans les eaux de boisson qui nous étaient adressées pour analyse bactériologique, 200 environ dans les eaux de rivière ou de piscine.

Le grand avantage de la méthode par rapport à celle classique par filtration est sa beaucoup plus grande rapidité. Le tout est de savoir si elle est suffisamment sensible, d'une part, et si, d'autre part, elle n'expose pas à des causes d'erreurs faussant les résultats par excès.

Pour répondre à ces deux questions, nous utiliserons uniquement les résultats obtenus avec la mise en œuvre parallèle pour la même eau des deux méthodes au chloroforme et à la filtration.

En ce qui concerne les eaux de boisson, les deux méthodes furent parallèlement mises en œuvre pour 444 eaux.

Une concordance absolue positive entre les deux méthodes, comportant d'ailleurs pratiquement toujours (3) positivité à + + +, fut observée pour 284 eaux. Deux cent quarante-quatre de ces eaux présentaient une

(2) Il serait préférable que cette culture ne dure que six à huit heures, mais les conditions de travail ne permettraient pas alors le respect de la chronologie des temps ultérieurs.

(3) Sauf dans un cas où l'image réalisée fut du type C ++, F ++.

ou plusieurs autres preuves de contamination fécale, dont le détail suit :

Présence de <i>E. coli</i> , CL. P., S. F. ....	45 cas
Présence de <i>E. coli</i> + S. F. ....	107 cas
Présence de <i>E. coli</i> seul ....	67 cas
Présence de <i>E. coli</i> + CL. P. ....	11 cas
Présence de S. F. seul ....	9 cas
Présence de CL. P. + S. F. ....	2 cas
Présence de CL. P. seul ....	3 cas
	_____
	244 cas

Quarante de ces eaux ne présentaient aucune autre preuve de contamination, sauf parfois présence de coliformes autres que l'*E. coli*; les 40 cas concernaient volontiers des eaux chlorées ou des eaux d'origines diverses qui étaient l'objet de contaminations intermittentes.

Une concordance non absolue fut constatée dans trois cas seulement :

1<sup>o</sup> Analyse n° 52021 (22 mars 1956). — C+++; F+; puits; pas d'autres tests de contamination, sauf 40 coliformes autres que *E. coli*.

2<sup>o</sup> Analyse n° 52265 (20 avril 1957). — C+++; F+++; puits; présence d'*E. coli* et CL. P.

3<sup>o</sup> Analyse n° 52733 (8 juin 1956). — C++; F+++; source; présence d'*E. coli*, CL. P. et S. F.

Une concordance absolue négative entre les deux méthodes fut observée pour 136 eaux. Vingt-neuf de ces eaux présentaient un ou plusieurs autres tests de contamination fécale dont le détail suit :

Présence de <i>E. coli</i> + CL. P. + S. F. ....	1 cas
Présence de <i>E. coli</i> + S. F. ....	5 cas
Présence de <i>E. coli</i> seul ....	15 cas
Présence de <i>E. coli</i> + CL. P. ....	1 cas
Présence de S. F. seul ....	6 cas
Présence de CL. P. seul ....	1 cas
	_____
	29 cas

Dans les 107 autres cas, n'existe aucun autre test de contamination fécale.

Ainsi, la présence d'un bactériophage fécal vérifiée par les deux techniques (chloroforme et filtration) coïncidait avec la présence d'au moins un autre test de contamination fécale dans 246 cas sur 284, soit 86 p. 100; son absence concordait avec l'absence d'un autre test de contamination fécale dans 105 cas sur 136, soit 71 p. 100.

Dans 21 cas une discordance fut observée entre les deux méthodes. L'image réalisée fut une fois seulement (analyse n° 52141) du type C : O, F : +++. Il s'agissait d'une eau d'adduction renfermant par litre 50 coliformes autres que l'*E. coli* et 20 S. F. Dans tous les autres cas, l'image réalisée fut du type C : +++, F : O. Dans un cas (analyse n° 53939), un deuxième essai par la méthode de filtration donna F : +++. Il s'agissait d'une eau renfermant 10 *E. coli* par litre, cependant que d'autres examens prouvaient qu'elle était l'objet d'une contamination intermittente. Dans un autre cas (analyse n° 54822), la filtration au deuxième essai donna B. F. ++, cependant que trois essais

à la méthode au chloroforme avaient tous trois donné le résultat +++. Il s'agissait d'une eau de puits renfermant 10 *E. coli* et 20 S. F. recueillie dans un pays (Pontcharra) dont les eaux sont habituellement contaminées avec présence d'un bactériophage fécal vérifiée par les deux méthodes. Dans 2 cas, un deuxième essai effectué avec la méthode au chloroforme donna un résultat négatif, les deux eaux ne présentant pas d'autres tests de contamination fécale. Dans 1 cas, le même résultat +++ fut observé par un deuxième essai par la technique au chloroforme. Il s'agissait d'une eau par ailleurs fortement contaminée. Dans les 15 autres cas qui ne priétèrent pas à deuxième essai, il s'agissait dans 6 cas d'eaux ne présentant pas d'autres tests de contamination fécale, dans 9 cas, d'eaux pour lesquelles un ou plusieurs autres tests étaient positifs.

En ce qui concerne les eaux de rivières, la recherche parallèle par les deux méthodes fut effectuée quarante-trois fois avec des résultats positifs concordants constants. Il s'agissait toujours d'eaux présentant une forte contamination microbienne avec positivité habituelle d'au moins deux autres tests de contamination fécale.

Ainsi, la méthode au chloroforme ne nous a pas paru pécher par défaut puisque sur 190 eaux, l'image C : O, F : +++ ne fut observée qu'une seule fois. Les cas relativement nombreux où l'image obtenue est du type C : +++, F : O peuvent s'interpréter comme relevant ou bien d'une plus grande sensibilité de la méthode au chloroforme, ou bien d'une erreur pas excès.

Pour tenter d'apprecier si la méthode au chloroforme est plus sensible, nous procédons depuis quelque temps, en cas de résultat positif, à la numération des phages. Jusqu'à présent, et sauf dans un cas (4), aucune différence n'a été observée entre les deux méthodes. Mais ces essais sont encore trop peu nombreux (28) pour que l'on puisse tirer conclusion ferme.

Par ailleurs et à trois reprises, nous nous sommes heurtés à des erreurs évidentes de la méthode au chloroforme, en ce sens qu'au cours de la même série tous les résultats étaient positifs. Une expérimentation très simple nous a démontré que, comme il fallait s'y attendre, ces erreurs par excès provenaient très certainement de la présence d'une parcelle de chloroforme dans la goutte prélevée au niveau du tube chloroformé, parcelle infime sans doute, mais suffisante pour gêner le développement du germe inoculé. D'où la nécessité de laisser déposer un temps suffisant et de prélever à la partie tout à fait supérieure du tube. D'où peut-être l'intérêt de la technique actuellement utilisée de procéder à une centrifugation plutôt qu'à un simple dépôt par gravité.

Lorsque ces erreurs en excès se produisent en série, il n'est pas difficile de les reconnaître. Mais il est évident que la même erreur peut se rencontrer à l'état isolé. D'où la règle que nous nous sommes fixée désormais :

En cas de positivité par la méthode au chloroforme, un deuxième essai est pratiqué par les deux méthodes de chloroforme et filtration et avec numération des éléments bactériophagiques rencontrés.

(4) Cas n° 57 264. C : +++ pour 50 ml, 25 ml et 5 ml d'eau. F : +++ pour 50 ml, et 25 ml, 0 pour 5 ml.

RÉSUMÉ. — Dans un laboratoire d'analyses d'eaux et depuis fin 1953, les auteurs ont appliqué la méthode au chloroforme pour la recherche des bactériophages fécaux dans les eaux de boisson et rivières. Le germe sensible utilisé est le *Sh. paradyssenteriae*. Les résultats obtenus sont bons, comme le montre une étude comparative avec la technique de filtration établie sur 487 cas, 444 eaux de boisson et 43 eaux de rivières. L'avantage de la méthode est sa beaucoup plus grande rapidité. Elle peut cependant entraîner des erreurs par excès, car la technique est délicate. Aussi les auteurs considèrent-ils qu'elle doit essentiellement être considérée comme une épreuve de dégrossissement. En cas de résultat positif, il est indispensable de procéder à un contrôle par la méthode de filtration, cependant que sera mise en œuvre une légère modification technique de la méthode obvie à la cause d'erreur signalée.

#### SUMMARY

#### EXAMINATION OF WATER FOR BACTERIOPHAGE BY THE CHLOROFORM TECHNIQUE.

Since the end of 1953, the authors have applied this technique to the examination of drink- and river water for the presence of bacteriophages. The sensitive germ used is *Shigella paradyssenteriae*. The results are good, as demonstrated by comparative study with the filtration technique on 444 samples of drink water and 43 samples of river-water.

The advantage of the method is its great rapidity. It may however be a cause of errors by excess, because it is rather difficult to perform. It can be used only as a first step. If a positive result is obtained, it must be checked by the filtration method and an enumeration of the phages.

---

### UN NOUVEAU SÉROTYPE DU GROUPE SALMONELLA ISOLÉ AU CONGO BELGE : **SALMONELLA KINTAMBO** (13,23 : g, m, t : —).

par E. van OYE, G. GHYSELS et A. GLAUDOT.

(Institut de Médecine Tropicale « Princesse-Astrid », Léopoldville  
[Directeur : Dr E. van OYE])

La nouvelle salmonelle qui sera décrite dans cette note a été isolée de l'intestin d'un lézard commun. Il s'agit d'un germe ayant les caractères culturels et morphologiques d'une Entérobactérie et dont les propriétés biochimiques sont les suivantes : fermentation, dans les vingt-quatre heures et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcite, de l'inosite, du glucose, du maltose, de la mannite, du rham-

nose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. Ne sont pas attaqués en trente jours : l'adonite, le lactose, le saccharose et la salicine.

Le germe produit de l' $H_2S$  et réduit les nitrates. La réaction de Stern est négative, ce qui est plutôt exceptionnel. Le test de Braun au KCN est négatif.

Il n'y a pas de production d'indole, ni de décomposition de l'urée. Par contre, la gélatine est liquéfiée (technique de Lautrop, 1956).

La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyl est positive.

Dans les milieux contenant des acides organiques on observe les réactions suivantes : D-tartrate +<sup>1</sup>, L-tartrate +<sup>1</sup>, I-tartrate +<sup>3</sup>, citrate de soude +<sup>1</sup> et mucate +<sup>1</sup>.

Ces réactions sont classiques d'un membre du groupe *Salmonella*, exception faite de la liquéfaction de la gélatine. Il est néanmoins permis de considérer ce germe comme un bacille paratyphique vrai.

La culture est agglutinée par un sérum polyvalent anti-O du groupe sérologique G. Selon le Dr Edwards (communication personnelle) l'antigène somatique est composé des facteurs O : 13, 23, 36 et le germe appartient donc au sous-groupe G.2. Selon le Dr Kauffmann (communication personnelle) il est permis d'adopter la formule antigénique simplifiée O : 13, 23.

L'antigène flagellaire est agglutiné par la plupart des sérums non absorbés du complexe anti-H : g, ... ainsi que par les sérums absorbés anti-H : g, anti-H : m et anti-H : t. Il ne l'est pas par les sérums absorbés anti-H : f, anti-H : p et anti-H : s.

Des essais en milieu semi-solide contenant les sérums anti-H : g, p et anti-H : m, t ont démontré que le germe est monophasique.

La structure antigénique peut donc être décrite par la formule = 13, 23 : g, m, t : —.

Le nom de *Salmonella kintambo* a été proposé et accepté.

Ce nouveau sérotype se distingue de *S. luanshya* et de *S. okatie* biochimiquement par la fermentation de l'inosite et sérologiquement par la structure de l'antigène flagellaire qui est ici « g, m, t » au lieu de « g, s, t ».

**RÉSUMÉ.** — Les auteurs décrivent un nouveau sérotype du groupe *Salmonella* isolé de l'intestin d'un lézard, au Congo belge. Sa formule antigénique est 13, 23 : g, m, t : —, et son nom *S. kintambo*.

#### SUMMARY

A NEW *Salmonella* SEROTYPE ISOLATED  
IN THE BELGIAN CONGO : *S. kintambo*.

A new *Salmonella* serotype, isolated from the intestines of a common lizard in the Belgian Congo, is described. The antigenic formula is 13, 23 : g, m, t : —, and the name *S. kintambo*.



Nous tenons à remercier les Drs P. R. Edwards (Communicable Disease Center, Atlanta, U. S. A.) et F. Kauffmann (Directeur du Centre

International des *Salmonellae*, Copenhague) pour leur très précieuse collaboration dans l'étude assez difficile de cette nouvelle salmonelle.

#### BIBLIOGRAPHIE

- EDWARDS (P. R.), NICEWONGER (C. R.) et TARRANT (W. G.). *Monthly Bull. Min. Hlth.*, 1957, **16**, 90.  
 KAUFFMANN (F.). *Ergebn. Mikrobiol. Immunitätsf.*, 1957, **30**, 160.  
 LAUTROP (H.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1956, **39**, 357.
- 

### COMPÉTITION ENTRE LE POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE DES SAPONIUMS ET L'ABONDANCE DE FACTEURS DE CROISSANCE

par Jacques POLONOVSKI et Georgette LEVY.

(*Laboratoire de Biochimie médicale,  
Faculté de Médecine de Paris*)

Depuis les travaux de Domagk [1], de Rahn [2] et de Valko [3, 4], on connaît le pouvoir bactériostatique très élevé des ammoniums quaternaires à chaîne grasse, ou *saponiums*. Nous avions nous-mêmes étudié le mode d'action de ces substances cationiques [5], qui s'attachent assez électivement aux lipoprotéines. Leur fixation à la surface des corps bactériens [4], même lorsque la modification de perméabilité n'entraîne pas la bactériolyse, suffit à empêcher la croissance bactérienne. L'effet se manifeste à partir d'un seuil de concentration qui est fonction du rapport saponium/nombre de corps bactériens [6, 7].

Ce travail a pour but de montrer l'influence qu'exerce la richesse du milieu de culture en facteurs de croissance sur le pouvoir bactériostatique du saponium.

Le saponium que nous avons utilisé est le zéphirol ou chlorure de benzalkonium (1) : il s'agit du chlorure d'alcoyl-benzylidiméthylammonium, correspondant à un mélange de dérivés synthétiques à chaînes grasses où prédomine le dérivé laurylique.

**TECHNIQUE.** — Cette recherche a été faite au moyen de la microtechnique microbiologique [8]. Choisissant un milieu de culture déterminé, privé d'un seul facteur de croissance, nous avons, dans une première série d'expériences, introduit une quantité fixe du facteur de croissance absent et dans ce milieu complet ainsi préparé, nous introduisons des doses croissantes de zéphirol. Selon la méthode microbiologique déjà citée, nous stérilisons

(1) Le chlorure de benzalkonium nous a été fourni par le laboratoire Clévenot (Nogent-sur-Marne), que nous remercions vivement.

à ce moment-là l'ensemble des tubes préparés, puis nous les ensemencons avec une souche de *Lactobacillus* déterminée. Les dosages ont été faits dans un premier temps après seize heures d'incubation à l'étuve à 37° C par la méthode néphéломétrique, puis, dans un deuxième temps, après trois jours d'incubation, par la méthode titrimétrique.

Nous avons ainsi étudié l'action du zéphirol sur deux souches différentes de *Lactobacillus* : *Lactobacillus casei* ATCC 7469 et *Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC 8014, les milieux choisis étant respectivement celui de Teply et Elvehjem [9], dont le facteur limitant est la riboflavine, et celui de Skeggs et Wright [10], dont le facteur limitant est le pantothenate de sodium.

En utilisant la microméthode [8], nous avons pris soin que tous les tubes contiennent toujours 2 ml de liquide y compris le milieu de culture, le facteur de croissance et le zéphirol, l'un ou l'autre étant remplacé par une quantité convenable d'eau bidistillée, lorsqu'il y avait lieu de le faire. Les quantités de zéphirol essayées sont exprimées en  $\mu\text{g}$  de zéphirol par tube.

**RÉSULTATS.** — 1<sup>o</sup> *Seuil de l'action bactériostatique.* — L'inhibition de la croissance se traduit au voisinage du seuil bactériostatique par un temps de latence plus ou moins long, à partir duquel la croissance démarre à une vitesse réduite. Pour *Lactobacillus arabinosus*, avec une dose de 20  $\mu\text{g}$  de pantothenate de sodium, l'inhibition est totale, même après trois jours d'incubation, à partir de 4  $\mu\text{g}$  de zéphirol par tube (2  $\mu\text{g}$  de zéphirol inhibent à 90 p. 100 la croissance après seize heures et seulement à 50 p. 100 après trois jours). Pour des doses comprises entre 0,1 et 4  $\mu\text{g}$ , on observe des inhibitions analogues, mais il semble qu'à partir du moment où la culture bactérienne a surmonté le pouvoir inhibiteur, le développement ne soit plus entravé, et il s'effectue à peu près normalement (fig. 1).

2<sup>o</sup> *Action compétitive du facteur de croissance.* — Ayant constaté la diminution relative de la croissance microbienne selon les quantités de zéphirol introduites dans les cultures, nous avons voulu nous rendre compte de l'action compétitive éventuelle du facteur de croissance sur le bacille.

Nous avons donc, d'une part, fait varier les quantités de zéphirol, d'autre part, les quantités du facteur de croissance introduites dans le milieu de culture. En choisissant comme précédemment le milieu de culture de Skeggs et Wright privé d'acide pantothenique, nous avons introduit des quantités d'acide pantothenique, allant de 0,5  $\mu\text{g}$  à 100  $\mu\text{g}$ , en faisant varier les quantités de zéphirol de 0,5 à 10  $\mu\text{g}$  par tube, chaque tube étant toujours ajusté de manière à contenir en tout 2 ml de solution totale.

— Nous constatons que l'augmentation de la concentration en facteur de croissance permet, en présence d'une quantité identique de zéphirol, d'obtenir une croissance bacillaire beaucoup plus importante. Cependant, comme dans l'expérience précédente, nous nous voyons obligés de tenir compte de la durée d'incubation qui modifie les résultats selon les doses mises en jeu.

Si l'on considère, par exemple, la dose type de 2  $\mu\text{g}$  de zéphirol : après seize heures d'incubation (fig. 1), la croissance microbienne est réduite à environ 10 p. 100 en présence de 20  $\mu\text{g}$  d'acide pantothenique.

nique, tandis que l'introduction de 100 m $\mu$ g de cet acide, pendant la même durée d'incubation, amène la croissance microbienne à environ 40 p. 100 par rapport à la croissance normale des microbes dans le milieu sans zéphirol. Si, d'autre part, on examine les résultats obtenus après trois jours d'incubation (fig. 2), les rapports ne sont pas les mêmes : en présence de 20 m $\mu$ g d'acide pantothénique, la croissance microbienne est de 50 p. 100 et en présence de 100 m $\mu$ g d'acide pantothénique, elle est de 60 p. 100.

Les différences de croissance obtenues selon les doses du facteur de croissance introduit sont bien moins divergentes après trois jours

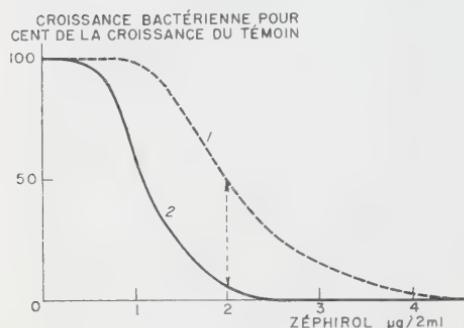


FIG. 1.

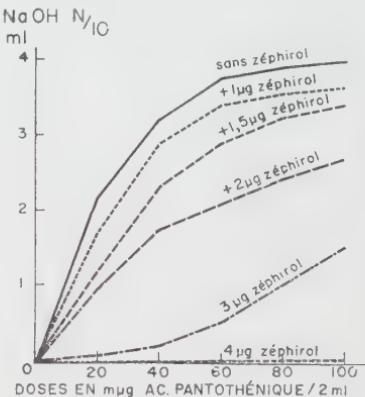


FIG. 2.

FIG. 1. — *Lact. arabinosus*. Milieu Skegg + Wright + 20 m $\mu$ g acide pantothénique par tube de 2 ml. ——— dosage néphéломétrique après seize heures à 37° ; ----- dosage d'acidité après soixante-huit heures à 37°.

FIG. 2. — Dosages titrimétriques après soixante-huit heures à 37°. Action compétitive du facteur de croissance. Doses variées de zéphirol (pour 2 ml). Doses variées d'acide pantothénique. *L. arabinosus*. Milieu Skegg + Wright.

d'incubation qu'après seize heures. Pour la dose de 3  $\mu$ g de zéphirol, la croissance microbienne, réduite pratiquement à zéro en présence de 20 ou de 100 m $\mu$ g d'acide pantothénique après seize heures d'incubation, est cependant notable après soixante-douze heures de séjour à l'étuve avec la dose de 100 m $\mu$ g d'acide pantothénique, tandis qu'avec 20 m $\mu$ g, elle est nulle. La dose de 4  $\mu$ g de zéphirol, même en présence de 100 m $\mu$ g d'acide pantothénique après trois jours d'incubation, inhibe totalement la croissance. Des séjours plus prolongés à l'étuve, allant de cinq à huit jours, permettent aux bactilles de surmonter partiellement l'inhibition provoquée par le zéphirol.

Nous avons étudié dans les mêmes conditions l'action compétitive de la riboflavine et du zéphirol en présence de *Lactobacillus casei* dans le milieu de Teply et Elvehjem ; les résultats obtenus sont analogues.

DISCUSSION. — Si dans certains cas l'action des saponiums peut être bactéricide par bactériolyse [7, 11], le plus souvent il ne s'agit que d'un effet bactériostatique et nos résultats en apportent encore une preuve, puisque le seuil d'inhibition dépend du temps d'incubation considéré. Ces résultats sont en accord avec ceux de Valko concernant l'adsorption superficielle du saponium sur les bactéries : si certaines bactéries surmontent l'effet inhibiteur et arrivent à se développer, elles trouvent un milieu de culture de plus en plus privé du saponium par cette adsorption sur les germes présents.

Nos résultats montrent par ailleurs que ce pouvoir des bactéries de « surmonter » l'effet inhibiteur du saponium dépend de la richesse du milieu en facteurs de croissance, c'est-à-dire probablement des possibilités métaboliques offertes à ces germes. Dans un milieu relativement pauvre en facteurs coenzymatiques, les possibilités d'adaptation des bactéries seraient plus faibles et les inhibiteurs auraient une efficacité plus grande.

Nous nous trouvons donc en présence d'un phénomène assez complexe d'interaction compétitive, au cours duquel le facteur inhibiteur saponium est partiellement contrecarré par un facteur de croissance favorable au développement. Ceci nous montre de plus qu'il est nécessaire de tenir compte d'une notion supplémentaire au cours des dosages microbiologiques, lorsque des facteurs compétitifs sont présents dans les milieux : le facteur durée d'incubation.

RÉSUMÉ. — Le seuil d'action bactériostatique d'un saponium sur la croissance de deux lactobacilles a été étudié en fonction de la richesse du milieu en facteur de croissance indispensable.

Le temps de latence durant lequel la bactérie « surmonte » l'action inhibitrice du saponium est considérablement abrégé par une dose plus élevée en facteur de croissance.

#### SUMMARY

#### COMPETITION BETWEEN THE BACTERIOSTATIC ACTIVITY OF SAPONIUMS AND GROWTH-FACTORS.

Study of the bacteriostatic activity of a saponium on two *Lactobacillus*. The threshold of this activity is in relation with the concentration of the necessary growth-factor present in the culture medium.

The latent period, during which the germ « overcomes » the inhibitory activity of the saponium is considerably reduced when the medium contains a high quantity of growth-factor.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DOMAGK (G.). *Dtsch. med. Wsch.*, 1935, **61**, 829.
- [2] RAHN (O.) et ESELTINE (W. P. VAN). *Ann. Rev. Microb.*, 1947, **4**, 173.
- [3] VALKO (E. I.) et DUBOIS (A. S.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 15.
- [4] VALKO (E. I.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **46**, 451.
- [5] POLONOVSKI (J.). *Ann. Chim.*, 1950, 671.

- [6] GALE (E. F.) et TAYLOR (E. S.). *J. gen. Microb.*, 1947, **4**, 77.  
 [7] POLONOVSKI (J.) et COTONI (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 1155.  
 [8] LÉVY (G.) et POLONOVSKI (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1221.  
 [9] TEPHY (L. J.) et ELVEHJEM (C. A.). *J. biol. Chem.*, 1945, **157**, 303.  
 [10] SKEGGS (H. R.) et WRIGHT (L. D.). *J. biol. Chem.*, 1944, **156**, 21.  
 [11] ROBERTS (M. H.) et RAHN (O.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 639.
- 

## MISE EN APPLICATION DES THÉORIES SUR L'EXTRACTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOCELLULAIRE

### I. — ACTION DE LA PÉNICILLINE

par H. MIR CHAMSY et A. SADEGH.

(Institut d'Etat Razi, Hessarek - Téhéran)

Pour la préparation de l'anatoxine tétanique, il est essentiel de filtrer la culture de *Pl. tetani* après cinq jours d'incubation à 33° C ou dans les jours suivants, afin d'éliminer les corps bactériens, et de formoler le filtrat toxique. Des recherches effectuées au cours de ces dernières années ont montré, d'autre part, la possibilité d'extraire à partir des bacilles tétaniques, en dehors de la culture, des quantités importantes de toxine. Ces recherches étant effectuées dans des conditions particulières, nous les avons reprises et modifiées pour extraire la toxine endobacillaire au sein de la culture même, ce qui peut augmenter à la fois la toxicité du filtrat et son pouvoir antigène.

Sans faire l'historique complet du problème de l'extraction des toxines à partir des corps microbiens, nous donnerons un aperçu des recherches antérieures.

Raynaud [2, 3, 4, 5] est le premier qui a montré la possibilité d'extraire la toxine tétanique des corps bactériens lavés.

Rappelons les principales conclusions de cet auteur et de ses collaborateurs [6] : la quantité de toxine extractible est d'autant plus faible que les cultures sont plus âgées ; lorsque la culture est effectuée à 35°, toute la toxine se trouve bien élaborée à la fin de la période de croissance exponentielle. Elle passe ensuite dans le milieu de culture, à la faveur d'un processus dont la nature exacte reste à préciser, mais qui est indépendant des processus de synthèse liés à la croissance microbienne.

Raynaud extrait les bactéries lavées à l'eau distillée, par des solutions hypertoniques à 0°. D'après lui, il n'y a pas intérêt à prolonger la durée de l'extraction au-delà de cinq jours. Les extractions trop prolongées, sans augmenter notablement le taux de toxine extraite, provoquent une solubilisation élevée de l'azote bactérien.

L'action de la pénicilline sur la libération de la toxine a été également étudiée. Katitch [1] observe que la culture à laquelle a été ajoutée la pénicilline a le même aspect à l'examen microscopique que la culture témoin. Il remarque ainsi que l'addition de pénicilline, même en grande quantité, n'a aucune action sur la production de la toxine. Raynaud [7] constate, d'autre part, que les suspensions du bacille tétanique par séjour à 33° C et en présence de pénicilline libèrent des quantités notables de toxine en même temps qu'une lyse bactérienne importante se produit.

Stone [8] a essayé de provoquer la lyse de *Pl. tetani* par addition de lysozyme. Il a remarqué que dans les cultures jeunes de 2-3 jours, le traitement par des doses massives de lysozyme provoque seulement la réduction du temps de flocculation sans qu'il y ait une augmentation des unités flocculantes. L'effet du lysozyme est nul dans le cas des cultures âgées de 5-6 jours.

Tels sont, à notre connaissance, les travaux récents effectués dans ce domaine ; nous allons décrire un résumé de nos expériences et des résultats que nous avons obtenus par traitement des cultures avec la pénicilline.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — On ensemence 50 erlenmeyers de 1 l contenant chacun 750 ml de milieu Mueller [9]. La semence est de 1 ml de la culture de 24 heures en milieu au thioglycollate. La souche utilisée est la souche Harvard. L'ensemencement a lieu immédiatement après autoclavage et refroidissement du milieu. La culture s'effectue à 33° C. A la fin de chaque vingt-quatre heures d'incubation, 5 erlenmeyers reçoivent 1 000 U. O. de pénicilline G par millilitre de culture ; les cultures pénicillinées restent encore vingt-quatre heures à 33° C, puis on les filtre sur papier filtre en présence d'hylosupercel. A titre de témoins, 5 erlenmeyers de culture normale sont filtrés.

La flocculation s'effectue avec une solution d'antitoxine étalon contrôlée par comparaison avec l'étalon danois et celui de l'Institut Pasteur de Garches. La pureté s'exprime en milligrammes d'azote précipitable par l'acide trichloracétique. Etant donné que le milieu noircit dans les premiers jours pour redevenir clair à la fin de la culture, il était difficile de suivre la marche exacte de la lyse bactérienne au photomètre ; nous nous bornons donc à apprécier la lyse par examen microscopique de 20 à 30 champs au microscope. Les bacilles lysés et colorés au Gram ont une morphologie particulière ; ils sont souvent vidés de leur contenu ; on ne voit que leur cytosquelette déchiré et même, quand la lyse est avancée, la distinction de la forme bactérienne devient difficile. La DMM est déterminée sur souris blanches de 16-18 g. Les dilutions sont faites dans l'eau peptonée. On injecte 0,5 ml par voie sous-cutanée.

En étudiant le tableau I, on voit d'abord que la pénicilline agit à toutes les phases de la culture en libérant la toxine. La quantité de toxine supplémentaire libérée par action de la pénicilline et exprimée en Lf est importante dans la phase exponentielle de la culture ; elle devient faible à la fin de la culture. Cependant, exprimée en DMM, elle est toujours importante. En effet, la culture de 24 heures pénicillinée renferme 100 000 DMM/ml, alors que le témoin ne contient que

10 000 DMM/ml. De même, la culture de 5 jours traitée à la pénicilline a une toxicité de l'ordre de 2 500 000 DMM/ml, son témoin de 5 jours a seulement 1 000 000 DMM/ml.

TABLEAU I. — Action de la pénicilline sur la culture tétanique.

	Culture pénicillinée					Culture témoin				
	1 <sup>o</sup> J.	2 <sup>o</sup> J.	3 <sup>o</sup> J.	4 <sup>o</sup> J.	5 <sup>o</sup> J.	1 <sup>o</sup> J.	2 <sup>o</sup> J.	3 <sup>o</sup> J.	4 <sup>o</sup> J.	5 <sup>o</sup> J.
Lf/ml	3	6	14	18	29	0	0	8	16	27
Kf/ml	63	55	35	20	11	-	-	45	25	12
DMM/ml	1x10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>			2,5 x 10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>			1x10 <sup>6</sup>
Lf/ag N.P			325	400	700			372	415	725 -
Lyse bactérienne %	80	70	90	90	95	0	1	10	15	20

La libération de la toxine par la pénicilline est associée à la lyse presque complète des bacilles dans toute la durée de la culture.

Enfin, le produit pénicilliné est moins pur car la libération de toxine par la lyse amène forcément l'augmentation de l'azote bactérien.

Nous avons étudié l'action de la pénicilline sur 10 lots de milieu Mueller dans des conditions semblables. D'une manière générale, malgré la différence remarquable de toxicité entre les cultures pénicillinées et les témoins, la valeur en Lf/ml gagnée n'est pas considérable. Cette valeur ne dépasse pas dans nos expériences 35 p. 100 du titre initial.

RÉSUMÉ. — Si on emploie le milieu de Mueller et la souche Harvard, on peut extraire, au cours et à la fin de la culture, la toxine tétanique incluse dans les bacilles par addition de la pénicilline.

Les valeurs en Lf/ml et DMM/ml sont nettement augmentées par rapport au témoin. L'extraction se fait dans le milieu même de la culture.

#### SUMMARY

#### APPLICATION OF THEORIES ON THE EXTRACTION OF ENDOCELLULAR TETANUS TOXIN.

#### I. — ACTION OF PENICILLIN.

By using Mueller's medium and Harvard strain, it is possible to extract the excess of tetanus toxin contained in the bacterial cells in the culture by addition of penicillin.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] KATITCH (R. V.). *Rev. Immunol.*, 1951, **45**, 371.
- [2] RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.
- [3] RAYNAUD (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 98.
- [4] RAYNAUD (M.), NISMAN (B.) et PRUDHOMME (R. O.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1370.

- [5] RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 356.
  - [6] RAYNAUD (M.), SAISSAC (R.), TURPIN (A.) et ROUYER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 693.
  - [7] RAYNAUD (M.), SAISSAC (R.), TURPIN (A.) et ROUYER (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 693.
  - [8] STONE (J. L.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 299.
  - [9] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 271.
- 

## MISE EN APPLICATION DES THÉORIES SUR L'EXTRACTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOCELLULAIRE

### II. — ACTION DE LA TRYPSINE

par H. MIR CHAMSY et F. NAZARI.

(Institut d'Etat Razi, Hessarek - Téhéran)

Dans une note antérieure [1], nous avons exposé nos recherches sur l'extraction de la toxine tétanique incluse dans les bacilles au cours et à la fin de la culture par action de la pénicilline. Dans le but d'intensifier et de régulariser la libération de cette toxine, nous avons cherché à remplacer la pénicilline par une protéase, la trypsine.

Cet article est le résumé des expériences réalisées et des résultats obtenus.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — Nos recherches ont porté sur une partie des lots de fabrication de toxine. Des cylindres de 10 l contenant 5 l de milieu Mueller [2], ensemencés avec 10 ml de culture de 24 heures de la souche Harvard et cultivés cinq jours à 33° C, sont soumis à l'action de la trypsine. On emploie la trypsine Difco à 1/250. On ajoute 1 mg de trypsine par millilitre de milieu. Le pH final de la culture de 5 jours étant 7,2-7,4, on ne le modifie pas. La digestion se fait dans un bain-marie à 37° C. Sur un cylindre contenant 5 l de culture soumis à l'action de la trypsine, on enlève au cours de la digestion des échantillons de 200 ml pour les titrages. L'échantillon est filtré sur papier filtre en présence d'hyflosupercl.

Le tableau I donne les résultats de cette expérience.

On voit d'abord qu'après une à deux heures de digestion le pouvoir antigène, exprimé en Lf/ml, passe de 20 à 32, soit une augmentation de 60 p. 100, le Kf est nettement diminué et la toxicité est doublée. Si on continue la digestion, le titre en Lf baisse et le Kf augmente régulièrement de sorte qu'après trente-six à quarante-huit heures de digestion il sera difficile d'identifier l'antigénicité du filtrat qui a perdu sa spécification. Un point important est l'évolution de la pureté de la toxine au cours de la digestion ; en effet, dans la première heure il

semble qu'il y ait seulement libération de la toxine sans que la structure bactérienne soit touchée sous l'action de l'enzyme ; on voit donc une augmentation de la pureté de la toxine obtenue. Si on continue la digestion, l'enzyme agit à la fois sur le microbe et sa toxine ; ainsi le titre et la pureté diminuent considérablement et, en même temps, le Kf s'allonge.

TABLEAU I. — Action de la trypsine sur la culture tétanique.

Heures de digestion!	Lf/ml	Kf/ml	Lf/mg.N.P.	D.I.M./ml. souris
0	20	23	400	$1,5 \times 10^6$
1/2 h.	25	13	426	
1 h.	32	11	450	$2 \times 10^6$
1h.30	32	10	405	$3 \times 10^6$
2 h.	31	10	392	
3 h.	30	13	385	
4 h.	28	15	360	$2 \times 10^6$
5 h.	26	18	357	
6 h.	20	25	312	
7 h.	18	30	278	
8 h.	15	40	214	

DÉTERMINATION DE LA TENEUR OPTIMUM EN TRYPSINE. — De ce qui précède on peut conclure que le maximum de toxine s'obtient entre soixante et quatre-vingt-dix minutes pour une quantité fixe de trypsine. Dans d'autres séries d'expériences on a cherché la qualité optimum de trypsine pour une durée constante de soixante-quinze minutes. Dans 15 erlenmeyers de 1 000 ml on met 500 ml de culture de 5 jours ; on ajoute des quantités croissantes de trypsine Difco et on laisse digérer soixante-quinze minutes à 37° C. On filtre ensuite le contenu de tous les erlenmeyers puis on les titre immédiatement.

Le tableau II est le schéma d'une de ces expériences.

TABLEAU II.

U.Trypsine/ml	1,25	1,00	0,75	0,62	0,50	0,37	0,25	0,18	0,12	0,06	0,025	0,0125	0,0050	0,0025	0
Lf/ml	23	25	25	25	30	31	31	35	40	40	33	31	30	30	30
Kf/ml	11	8	8	8	7	6	6	5	5	5	7	7	8	8	11

A partir d'une culture à 30 Lf/ml on obtient, après soixante-quinze minutes de digestion en présence de 0,06 U de trypsine par millilitre, une toxine à 40 Lf/ml, soit une augmentation de 33 p. 100. Dans de nombreux essais, nous avons constaté que l'optimum de trypsine est de 0,06 à 0,12 U de trypsine Difco pour soixante-quinze minutes de contact.

La libération de toxine semble être liée à la protéolyse ménagée des bacilles sous l'action de la trypsine. Nous pensons que la trypsine pure est moins active que l'enzyme moins purifié ; en effet, nous avons observé que pour obtenir le maximum de toxine dans des conditions rigoureusement identiques, il fallait employer dix fois plus de trypsine hautement purifiée que de trypsine ordinaire du commerce (1). Nous avons de même observé que la lipase pancréatique est incapable de libérer la toxine tétanique des corps bacillaires à pH 7,2-7,4.

**INHIBITION DE LA TRYPSINE.** — Pour arrêter l'action de la trypsine à la fin de la digestion, nous avons essayé plusieurs moyens. Les méthodes classiques telles que le chauffage ou les variations de pH dénaturent la toxine.

L'addition de formol et l'incubation de la toxine trypsinée à l'étuve détruisent également le pouvoir antigène.

L'addition de l'inhibiteur de Soja à raison de 0,04 mg/ml inhibe définitivement la trypsine sans toucher à l'antigène. Ce produit étant difficile à obtenir, nous l'avons remplacé par la protéine inhibitrice de la trypsine, isolée du blanc d'œuf suivant la technique de Balls et Swenson [3] (2).

Cette protéine, additionnée à raison de 0,4 mg/ml de culture, inhibe également l'action de la trypsine sans nuire à l'antigène.

**RÉSUMÉ.** — En employant le milieu de Mueller et la souche Harvard, il est possible d'extraire la toxine tétanique incluse dans les bacilles à la fin de la culture pour augmenter considérablement la toxicité et l'antigénicité du produit final.

Cette libération de toxine se fait dans la culture même, sous l'action d'un enzyme protéolytique comme la trypsine.

## SUMMARY

### APPLICATION OF THEORIES ON THE EXTRACTION OF ENDOCELLULAR TETANUS TOXIN.

#### II. — ACTION OF TRYPSIN.

The tetanus toxin contained in the bacterial cells of a Harvard strain culture in Mueller's medium can be extracted in order to increase the toxicity and the antigenicity of the final product. The release of toxin is realized in the culture by the action of trypsin.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIR CHAMSY (H.) et SADEGH (A.). *Ann. Inst. Pasteur.*
- [2] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Baet.*, 1954, **67**, 271.
- [3] BALLS (A. K.) et SWENSON (T. L.). *J. biol. Chem.*, 1934, **106**, 409.

(1) Nous remercions M. le professeur A. de Barbierie, Directeur Scientifique de l'Institut Sérothérapique de Milan, qui nous a envoyé un échantillon de trypsine très pure Z. A. à 53 U. N./mg.

(2) Nous remercions notre collègue le Dr J.-L. Delsal, Chef du Service de Biochimie de l'Institut Razi, qui a bien voulu nous préparer la protéine inhibitrice de trypsine à partir du blanc d'œuf.

### III. — LA CRYOEXTRACTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOBACILLAIRE

par H. MIR CHAMSY.

(Institut d'Etat Razi, Hessarek - Téhéran)

Dans deux notes précédentes [1, 2], nous avons démontré la possibilité d'extraire la toxine incluse dans les bacilles tétaniques par addition de pénicilline ou par une protéolyse ménagée avec la trypsine, en opérant dans le milieu de culture lui-même.

En appliquant les procédés dont nous avons décrit les détails, le titre flocculant augmente de 15 à 35 p. 100 et la toxicité, exprimée en nombre de doses létales par millilitre pour la souris blanche, double ou triple.

Nous avons cherché ensuite d'autres moyens pour obtenir ces résultats sans intervention de pénicilline ou de trypsine qui ont l'inconvénient d'augmenter par leur simple présence l'impureté des préparations ; de plus, l'addition de trypsine exige l'emploi d'un inhibiteur de nature protéinique, ce qui augmente également la teneur en protéines non spécifiques.

Après diverses tentatives, nous nous sommes orienté vers l'emploi du froid qui est un agent idéal pour extraire la toxine endobacillaire sans modifier sa pureté.

Cet article est le résumé des expériences réalisées et des résultats déjà obtenus.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — Des cylindres de 10 l contenant 5 l de milieu Mueller [3] sontensemencés avec 10 ml d'une culture de 24 heures en milieu au thioglycollate Difco en utilisant la souche Harvard de *Pl. tetani*. Après cinq jours d'incubation à 33° C, on vérifie d'abord la pureté bactériologique des cultures puis on mélange le contenu des cylindres pour les diviser en trois lots de 25 l. Le premier lot sert de témoin ; on le filtre comme d'habitude, d'abord sur papier filtre en présence d'hylosupercel, puis sur des plaques stérilisantes EK ; le deuxième lot est conservé quatre à six jours à +4° C, puis on le filtre de la même façon ; enfin le troisième lot est congelé dans la chambre froide à -- 16° C, puis décongelé à 37° C et filtré comme les lots précédents.

La DMM est déterminée sur des souris blanches de 16-18 g en diluant la toxine dans l'eau peptonée et en injectant 0,5 ml des dilutions sous la peau de la souris. La flocculation s'effectue avec la méthode de G. Ramon [4] en utilisant de l'antitoxine purifiée ne possédant qu'une seule zone de flocculation.

Certains résultats obtenus sont notés dans le tableau I.

On voit d'abord que la simple conservation des cultures quatre à six jours à +4° C augmente le titre flocculant de 21 à 66 p. 100. La toxicité est également augmentée trois à dix fois.

TABLEAU I.

N°	Témoin			Culture restée 4-6 jours à +4°C.			Culture congelée et décongelée					
	Lf/ml	Kf	D.W.M.	Lf/mg	Kf	D.W.M.	Lf/ml	Kf	D.W.M.	Lf/mg		
	Mn.	ml.	N.P.	Mn.	ml.	N.P.	Mn.	ml.	N.P.			
42	42	9	$3 \times 10^6$	840	51	2	$3 \times 10^7$	895	50	4	$3 \times 10^7$	910
43	35	6	$15 \times 10^6$	738	50	3	$15 \times 10^7$	750	47	4	$16 \times 10^7$	790
44	32	9	$1 \times 10^7$	680	40	5	$7 \times 10^7$	720	45	3	$8 \times 10^7$	750
45	36	1	$2 \times 10^7$	760	60	3	$16 \times 10^7$	850	54	5	$18 \times 10^7$	860
46	35	11	$1,8 \times 10^7$	705	43	6	$8 \times 10^7$	720	45	6	$8 \times 10^7$	735

En ce qui concerne l'effet de la congélation suivie de décongélation, on gagne 28 à 50 p. 100 en Lf/ml et la toxicité augmente de quatre à douze fois.

Le point remarquable dans ces expériences est l'augmentation de la pureté des produits traités, ce qui peut être attribué, en plus de la libération de toxine, à l'insolubilisation de certaines protéines bactériennes par l'action du froid et surtout à la suite de congélation et de décongélation, comme nous l'avons démontré à propos des anatoxines tétaniques en collaboration avec J.-L. Delsal [5].

RÉSUMÉ. — En conservant la culture finale de *Pl. tetani*, souche Harvard, dans le milieu de Mueller, quatre à six jours à +4°C, la toxine incluse dans les bacilles diffuse dans le milieu.

En appliquant ce procédé on gagne de 25 à 65 p. 100 en Lf/ml ; la toxicité, comparée avec le témoin, augmente de trois à dix fois. Les mêmes résultats s'obtiennent si la culture est congelée et décongelée.

## SUMMARY

### III. — THE CRYOEXTRACTION OF ENDOBACILLARY TETANUS TOXIN.

By keeping a tetanus culture (Harvard strain) on Mueller's medium, at low temperature for 4-6 days the toxin of the bacterial cells is released. By applying this technique the Lf value increased about 25 to 65 p. 100 and the m.l.d. 3 to 10 times when compared with controls.

The same result can be obtained by alternate freezing and thawing of the above mentioned culture.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIR CHAMSY (H.) et SADEGH (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957.
- [2] MIR CHAMSY (H.) et NAZARI (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957.
- [3] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 271.
- [4] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **74**, 661 et 711.
- [5] DELSAL (J. L.) et MIR CHAMSY (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 600.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Apparition du genre *Serratia* en pathologie humaine. Etude microbiologique de 15 souches**, par L. MOLLARET et R. CHAMFEUIL.

**Action de la rovamycine sur l'infection expérimentale de la souris par *H. pertussis***, par R. GASTAL.

**Note sur le diagnostic de la variole au laboratoire**, par H. DARRASSE, P. BRES et R. CAMAIN.

**Etude du venin de *Vipera xanthina palestina* et d'*Echis carinata***, par Y. IZARD et P. BOQUET.

**Le facteur sérique Gma au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques**, par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK, F. JACQUELINE et A. EYQUEM.

**La numération des germes telluriques par la microscopie directe en lumière blanche et en fluorescence**, par J. AUGIER et J. POCHON.

**Culture du virus de la fièvre aphteuse (type O) en cultures de tissus de reins de porc. II. Etude au microscope électronique de l'évolution des cellules infectées**, par P. GUILLOT.

#### LIVRES REÇUS

*Les infestations à Trichomonas. Premier Symposium européen (Reims, mai 1957) organisé par la Société Française de Gynécologie.* 1 vol., 382 p., 25 fig., Masson, édit., Paris, 1957. Prix : 3 000 fr.

La fréquence croissante des infestations à *Trichomonas* a mis cette affection en vedette, et leur épidémiologie a fait ces dernières années des progrès décisifs. La contamination vénérienne semble prouvée dans l'immense majorité des cas, mais il reste des faits où elle n'est pas en cause. D'autre part, alors qu'autrefois les vaginites à *Trichomonas* obéissaient à des traitements variés relativement simples, beaucoup de formes actuellement ont tendance à s'inviter ou à récidiver.

Il faut aussi reconnaître l'infestation à *Trichomonas*, non seulement dans sa forme classique de vaginite génératrice de leucorrhée, mais aussi derrière des symptômes fonctionnels simulant un cancer du col ou une salpingite. La trichomonase est ainsi devenue un syndrome uro-génital avec une fréquence aussi marquée dans le tractus urinaire que dans les organes génitaux.

H. T.